

Aus der Klinik für Innere Medizin und Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. J. Hoyer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Hinweise für die funktionelle und dynamische
Mikrokompartimentierung von Caveolin-1, TRPV4
und Calcium-aktivierten Kaliumkanälen in den
Caveolae von Endothelzellen**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sybelle Goedicke-Fritz (geb. Goedicke)
aus Frankfurt am Main

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 09.02.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Joachim Hoyer

1. Korreferent: Prof. Dr. Oberwinkler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Glossar verwendeter Abkürzungen	VIII
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Klinischer Hintergrund: Arterielle Hypertonie	1
1.2 Das vaskuläre Endothel	1
1.2.1 Funktion des Endothels bei der Gefäßtonusregulation	2
1.3 Rolle von Calcium-Ionen bei der endothelabhängigen Vasodilatation	7
1.3.1 Stimulation des Endothels durch humorale Faktoren	8
1.3.2 Stimulation des Endothels durch hämodynamische Kräfte	8
1.4 Nicht-selektive Kationenkanäle	10
1.4.1 Die Familie der TRP-Kanäle	10
1.4.2 TRP-Vanilloid-Subfamilie und der TRPV4-Kanal	13
1.5 Kaliumkanäle	16
1.5.1 Die Familie der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle	16
1.5.2 Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal (IK, <i>intermediate conductance</i>)	18
1.5.3 Der $K_{Ca2.3}$ -Kanal (SK, <i>small-conductance</i>)	20
1.6 Die Caveolae	22
1.6.1 Caveoline und Caveolin-1	25
1.6.2 Caveolin-1-defiziente Mäuse	28
1.7 Fragestellung	29
2 Material	31
2.1 Geräte	31
2.2 Chemikalien	33

2.3	Antikörper und Sekundärreagenzien	35
2.4	Standards	37
2.5	Standardisierte-Systeme	37
2.6	Nährmedien	37
2.7	Tiere	38
2.8	Zelllinien	38
2.8.1	HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells):	38
2.8.2	CAEC (<i>Carotid Artery Endothelial Cells</i>):	38
2.9	Allgemeine Puffer und Lösungen	39
3	Methoden	41
3.1	Zellkultur	41
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	41
3.1.2	Zellzahlbestimmung	41
3.1.3	Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin	42
3.2	Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen	43
3.2.1	Kegel-Platten-Viskosimeter	43
3.2.2	Flusskammern-Pumpsystem	46
3.3	Molekularbiologische Methoden	49
3.3.1	RNA-Isolation	49
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
3.3.3	Reverse Transkription für cDNA-Synthese	50
3.3.4	PCR	51
3.3.5	Agarosegelelektrophorese	53
3.4	Proteinbiochemische Methoden	54
3.4.1	Zellernte	54
3.4.2	Präparation von Gesamtproteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	54
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	54
3.4.4	Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	55
3.4.5	Präzipitation von Membranproteinen	56
3.4.6	(Ko-)Immunpräzipitation	56
3.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.4.8	Western Blot und Immundetektion	58
3.5	Immunfluoreszenz	59
3.5.1	Immunfluoreszenzfärbung für Mikroskopie	59
3.5.2	Immunfluoreszenzfärbung für die GSDIM-Mikroskopie	59
3.6	Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen	60

3.6.1	Konventionelle Lichtmikroskopie-----	60
3.6.2	Hochauflösende Mikroskopie-----	60
3.7	Tierhaltung, Tierzucht und Genotypisierung-----	62
3.8	Elektrophysiologische Patch-Clamp Untersuchungen -----	64
3.8.1	Grundprinzip -----	64
3.8.2	Whole-Cell-Modus-----	65
3.8.3	Versuchsaufbau-----	66
3.8.4	Aufbau des elektrischen Messkreises -----	67
3.8.5	Versuchsablauf-----	68
3.8.6	Datenaufzeichnung und Datenauswertung-----	68
3.9	Statistische Analyse -----	69
4	Ergebnisse -----	70
4.1	Charakterisierung der Kompartimentierung der endothelialen Caveolae -----	70
4.1.1	Expression von Caveolin-1, TRPV4 und den K_{Ca} -Kanälen $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen -----	70
4.1.2	Anreicherung von TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ in der caveolären Membranfraktion in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen-----	72
4.1.3	Räumliche Assoziation von Caveolin-1 mit $K_{Ca2.3}$ - und TRPV4-Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen -----	74
4.1.4	Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 mit $K_{Ca2.3}$ - und TRPV4-Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen-----	77
4.2	Untersuchung einer putativen Interaktion von TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen-----	79
4.2.1	Räumliche Assoziation von TRPV4- und $K_{Ca2.3}$ -Kanälen -----	79
4.2.2	Protein-Protein-Interaktion von $K_{Ca2.3}$ und TRPV4 -----	81
4.2.3	Relevanz der caveolären Struktur für die Protein-Protein-Interaktion von $K_{Ca2.3}$ und TRPV4-----	82
4.3	Einfluss von hämodynamischen Kräften auf die räumliche Assoziation von $K_{Ca3.1}$ zu Caveolin-1 und TRPV4 -----	84
4.3.1	Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst Interaktion von $K_{Ca3.1}$ und Caveolin-1 -----	85
4.3.2	Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst die räumliche Assoziation von $K_{Ca3.1}$ und Caveolin-1 -----	87
4.3.3	Applikation laminarer Schubspannung hat keinen Einfluss auf die räumliche Assoziation von $K_{Ca3.1}$ und Clathrin -----	89
4.3.4	Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst die räumliche Assoziation von $K_{Ca3.1}$ und TRPV4 -----	91

4.4	Relevanz von Caveolin-1 für die $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ -Funktionen	93
4.4.1	Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus	94
5	Diskussion	97
5.1	Auswahl des endothelialen Zellsystems	98
5.2	$K_{Ca2.3}$ - und TRPV4-Kanäle sind in Caveolae humaner mikrovaskulärer Zellen angereichert	100
5.3	Caveolin-1 kolokalisiert unter statischen Bedingungen mit $K_{Ca2.3}$ und TRPV4, aber nicht mit $K_{Ca3.1}$, in humanen mikrovaskulären Endothelzellen	102
5.4	Caveolin-1 interagieren mit $K_{Ca2.3}$ und TRPV4, aber nicht mit $K_{Ca3.1}$, in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen	104
5.5	TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ Kanäle kolokalisieren und interagieren in Caveolae humaner Endothelzellen	107
5.6	Applikation laminarer Schubspannung induziert eine <i>de novo</i> Assoziation von $K_{Ca3.1}$ -Kanälen mit Caveolin-1 und TRPV4 in humanen Endothelzellen	109
5.7	Caveolin-1-Deletion <i>in vivo</i> führt zu einer Abnahme der endothelialen K_{Ca} -Funktionen	111
5.8	Zusammenfassende Beurteilung	112
6	Literaturverzeichnis	114
7	Anhang	138
7.1	Publikationen	138
7.2	Wissenschaftliche Vorträge und Posterpräsentationen	138
7.3	Wissenschaftliche Auszeichnungen	139
7.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	139
7.5	Danksagung	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das Endothel reguliert die endothelabhängige Vasodilatation.	3
Abbildung 1-2: NO-Synthase-katalysierte Bildung von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin.	4
Abbildung 1-3: Auf das Endothel wirkende biomechanische Kräfte	9
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der postulierten Domänenstruktur der TRP-Kanäle.....	11
Abbildung 1-5: Übersicht über die Strukturen der Transient-receptor-potential –Subfamilien.....	12
Abbildung 1-6: Der TRPV4-Kanal innerhalb der Zellmembran.....	14
Abbildung 1-7: Die K_{Ca} -Kanäle werden in drei Gruppen unterteilt: BK_{Ca} -, SK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle.	17
Abbildung 1-8: Schematischer Aufbau von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$	19
Abbildung 1-9: Clotrimazol und sein Derivat TRAM-34 bilden spezifische Blocker für $K_{Ca3.1}$	20
Abbildung 1-10: Apamin und UCL1684 bilden spezifische Blocker für $K_{Ca2.3}$	22
Abbildung 1-11: Caveolae und Caveoline.	23
Abbildung 1-12: Primäre Struktur des Caveolin-1.	26
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der Caveolae als Mikrokompartment.	30
Abbildung 3-1: Strukturformel und Wirkungsmechanismus von Methyl- β -Cyclodextrin.	42
Abbildung 3-2: Kegel-Platten-Viskosimeter.	43
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Kegel-Platten-Viskosimeters.	44
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung eines μ -Slide I 0.6 Luer.	46
Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau des Flusskammern-Pumpsystems unter positivem Pumpendruck.	47
Abbildung 3-6: Mikrotubuli-Cytoskelett lebender Ptk2 Zellen.....	60
Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des GSDIM-Prinzips auf Grundlage eines vereinfachten Jablonski-Diagrammes.	61
Abbildung 3-8: Schematische Darstellung des Whole-Cell-Modus bei der Patch-Clamp-Untersuchung.	66
Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des Patch-Clamp Messkreises.	67
Abbildung 4-1: Expressionsanalyse mittels RT-PCR in HMEC-1.	71
Abbildung 4-2: $K_{Ca2.3}$ und TRPV4-Kanäle sind in der Caveolae von humanen mikrovaskulären Endothelzellen angereichert.	73
Abbildung 4-3: Caveolin-1 kolokalisiert mit TRPV4 und $K_{Ca2.3}$, aber nicht mit $K_{Ca3.1}$ in humanen Endothelzellen unter statischen Bedingungen.	76
Abbildung 4-4: Protein-Protein-Interaktionen von Caveolin-1 mit TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen.....	78
Abbildung 4-5: Räumliche Assoziation von TRPV4- und $K_{Ca2.3}$ - Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen.	80
Abbildung 4-6: Protein-Protein-Interaktionen von $K_{Ca2.3}$ und TRPV4.	82
Abbildung 4-7: Dissoziation der räumlichen Struktur der Caveolae durch Methyl- β -Cyclodextrin führt zum Verlust der Protein-Interaktion von $K_{Ca2.3}$ und TRPV4.	83
Abbildung 4-8: Ausrichtung von HMEC-1 unter 15 dyn/cm^2	85

<i>Abbildung 4-9: Applikation von Schubspannung führt zur Interaktion von Caveolin-1 und $K_{Ca}3.1$.</i>	86
<i>Abbildung 4-10: De novo Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1.</i>	88
<i>Abbildung 4-11: Applikation laminarer Schubspannung hat keinen Einfluss auf die Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit Clathrin in HMEC-1.</i>	90
<i>Abbildung 4-12: Applikation laminarer Schubspannung führt zu de novo Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit TRPV4 in HMEC-1.</i>	92
<i>Abbildung 4-13: Überprüfung des Genotyps mittels PCR und Western Blot Analyse.</i>	94
<i>Abbildung 4-14: Verlust von Caveolin-1 führt zu reduzierten K_{Ca}-Funktionen an frisch isolierten Endothelzellen aus der Arteria carotis communis der Maus.</i>	95

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1: Vergleich von $K_{Ca}3.1$ und $K_{Ca}2.3$. Modifiziert nach (Ledoux et al. 2006).</i>	21
<i>Tabelle 2-1: Verwendete Geräte</i>	31
<i>Tabelle 2-2: Verwendete Reagenzien</i>	33
<i>Tabelle 2-3: Primäre Antikörper</i>	35
<i>Tabelle 2-4: Sekundäre Antikörper und Sekundärreagenzien</i>	36
<i>Tabelle 2-5: Verwendete Kit-Systeme</i>	37
<i>Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien mit entsprechendem Medium</i>	38
<i>Tabelle 2-7: Verwendete Puffer und Lösungen</i>	39
<i>Tabelle 3-1: Schubspannungs-Profil für HMEC-1</i>	49
<i>Tabelle 3-2: iScript-Reaktionsansatz</i>	50
<i>Tabelle 3-3: iScript Thermoprofil</i>	50
<i>Tabelle 3-4: Verwendeter sense- und antisense-Primer</i>	51
<i>Tabelle 3-5: Übersicht über die zu erwartenden Produktlängen (bp)</i>	52
<i>Tabelle 3-6: PCR-Bedingungen</i>	52
<i>Tabelle 3-7: PCR-Programm</i>	53
<i>Tabelle 3-8: Trennbereiche von Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentration</i>	57
<i>Tabelle 3-9: Verwendeter sense- und antisense-Primer für Caveolin-1 Genotypisierung</i>	62
<i>Tabelle 3-10: PCR-Programm für Caveolin-1 Genotypisierung</i>	63
<i>Tabelle 3-11: PCR-Bedingungen für Caveolin-1 Genotypisierung</i>	63

Glossar verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
[Ca²⁺]_{frei}	Freie Ca ²⁺ -Konzentration
CAEC	<i>Carotid Artery Endothelial Cells</i>
CaM	Calmodulin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_f	Referenzkapazität
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat)
Caveolin-1	Caveolin-1
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
dest. H₂O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDHF	<i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>

EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
et al.	<i>(et alteris)</i> und andere
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSDIM	<i>Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return</i>
h	Stunde(n)
HMEC-1	<i>human dermal microvascular endothelium cells</i>
I	Stromstärke
IC₅₀	Inhibiting concentration 50 %
I_f	Kompensationsstrom
Ig	Immunglobulin
K_{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal
K_{Ca}2.3	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit niedriger Leitfähigkeit
K_{Ca}3.1	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit
LSS	Laminare Schubspannung
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mk	monoklonal
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
P	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGI₂	Prostazyklin
pH	pH-Wert, pondus hydrogenii
pk	polyklonal
R	Widerstand
R_f	Rückkopplungswiderstand
RNA	Rionukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutionsper minute</i>)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	<i>Standard error</i> , Standardfehler des Mittelwerts
TBS(-T)	<i>tris bufferd saline</i> (Tween 20)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRAM-34	Triarylmethan-34 = 1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TRP	<i>transcient receptor potential</i>
U	Spannung
U_{Aus}	Ausgangsspannung
U_{Pip}	Klemmspannung, Haltepotential
U_{Soll}	Sollspannung
V	Volt
(v/v)	<i>volume/volume</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> , Glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp
(w/v)	<i>weight/volume</i>

Zusammenfassung

Noch immer zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Besonders die arterielle Hypertonie stellt nach wie vor einen Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. So geht Bluthochdruck stets mit einer endothelialen Dysfunktion, Athero- und Arteriosklerose, und pathologischen Gefäßveränderungen einher. Zur Regulation des Blutdruckes setzt das Endothel vasodilatatorische und vasokonstriktorische Faktoren frei und beeinflusst so den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur. Zu den am längsten bekannten endothelabhängigen Vasodilatoren gehören Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO). Neben ihnen besitzt das Endothel ein drittes gefäßerweiterndes System, den *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Während die Funktionen des endothelialen NO und des PGI_2 für die lokale und systemische Blutdruckregulation heute weitestgehend bekannt sind, sind die biologischen Mechanismen und Signaltransduktionskaskaden des EDHF noch nicht vollständig geklärt.

Insbesondere Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle, zu denen $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ zählen, spielen eine entscheidende Rolle in der endothelabhängigen Hyperpolarisation und in der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdruckes. Die Aktivierung dieser beiden K_{Ca} -Kanäle beruht auf einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, die weitestgehend durch Ca^{2+} -durchlässige Kationenkanäle, einschließlich dem *transient receptor potential V4* (TRPV4), vermittelt werden. Es wird vermutet, dass K_{Ca} -Kanäle und Ca^{2+} -durchlässige Kationenkanäle räumlich assoziiert sind, eine funktionelle Einheit bilden und die Caveolae der Zellmembran hier als Mikrokompimente dienen.

Caveolae können als mikroskopisch kleine, sackförmige Einstülpungen an der Oberfläche vieler Säugerzelltypen beobachtet werden. Sie haben eine einzigartige Lipidzusammensetzung und werden wegen ihres hohen Gehalts an Cholesterin und Sphingolipiden zu den „*Lipid Rafts*“ gezählt. Die Caveolae sind an zahlreichen zellulären und physiologischen Prozessen beteiligt, z.B. Endozytose, Transzytose, Fettstoffwechsel, Virus-Wirt-Interaktion, Krebs und Signaltransduktion. Das integrale Membranprotein Caveolin-1 stellt das Hauptstrukturprotein der Caveolae dar.

Die vorliegende Arbeit hat sich mit der Frage beschäftigt, ob die endothelialen K_{Ca} -Kanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und der Ca^{2+} -durchlässige Kationenkanal TRPV4 in den Caveolae angereichert sind und welchen Effekt ein Fehlen von Caveolin-1, dem Strukturprotein der Caveolae, *in vivo* auf die genannten K_{Ca} -Ströme hat. Es konnte gezeigt werden, dass TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ in den Caveolae humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1) angereichert sind. Mit Hilfe von Immunpräzipitations-Studien

und immunzytologischen Untersuchungen sowie hochauflösender Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) unter statischen Bedingungen eine physikalisch und Caveolae-abhängige Assoziation zwischen Caveolin-1, TRPV4 und dem $K_{Ca2.3}$ aber nicht mit $K_{Ca3.1}$ besteht. Zudem konnten wir eine Interaktion und Kollokalisierung zwischen TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ beobachten. Schließlich konnten wir nach Applikation laminarer Schubspannung eine *de novo* Kollokalisierung von $K_{Ca3.1}$ /Caveolin-1 und $K_{Ca3.1}$ /TRPV4 nachweisen. Anhand von Patch-Clamp Versuchen an frisch isolierten Endothelzellen der *Arteria carotis communis* von Caveolin-1-defizienten Mäusen konnte eine 45 %-ige Reduktion der K_{Ca} -vermittelten Kaliumströme im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen gezeigt werden (-54 % für $K_{Ca2.3}$ und -40 % für $K_{Ca3.1}$).

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise für eine dynamische Mikrokompartimentierung von TRPV4/ K_{Ca} in Caveolae von Endothelzellen und zeigt die Bedeutung des Caveolin-1 für die endothelialen K_{Ca} -Funktionen.

Summary

Cardiovascular diseases are the major cause of death worldwide. Especially arterial hypertension contributes as a risk factor for cardiovascular diseases. Hypertension is often associated with endothelial dysfunction, athero- and arteriosclerosis, and pathological vascular remodeling. For blood pressure regulation, the endothelium releases relaxing and contracting factors and thereby adjusts smooth muscle contractility. Prostacyclin (PGI_2) and nitric oxide (NO) were the earliest identified endothelium-dependent vasodilators. Next to them, the endothelium possess a third vasodilator system, the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). While the role of endothelial NO and PGI_2 for local and systemic blood pressure control is well established, the nature of EDHF and EDHF-signalling pathways is not fully understood.

However, Ca^{2+} -activated K^+ channels (K_{Ca}) play a pivotal role in the endothelium-dependent hyperpolarization and regulation of vascular tone and blood pressure. For activation, K_{Ca} depend on an increase of intracellular calcium which is substantially mediated by Ca^{2+} -permeable cation channels including the *transient receptor potential* V4 (TRPV4). It has been proposed that K_{Ca} - and Ca^{2+} -permeable cation channels may be spatially associated to form functional units, and caveolae of the cell membrane have been suggested as possible scaffolds for such microcompartmental organization.

Caveolae are small, omega-shaped membrane invaginations present on the surface of many mammalian cell types. They are enriched in cholesterol and sphingolipids and therefore represent lipid-raft microdomains. Caveolae function in a variety of cellular and physiological processes including endocytosis, transcytosis, lipid regulation, signaling, pathogen entry and cancer. Caveolin-1, an integral membrane protein, is the major coat protein of caveolae.

In this study we asked the question whether endothelial K_{Ca} and TRPV4 are enriched in caveolae and whether deletion of caveolin 1 (Caveolin-1), the major structural protein of caveolae, affects K_{Ca} -currents *in vivo*. We show that TRPV4 and small-conductance $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ are enriched in caveolae of human microvascular endothelial cells. Using immunoprecipitation, immunocytology and superresolution microscopy, we found that a close and caveolae-dependent association exists between caveolin-1, TRPV4 and small conductance $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$, but not intermediate conductance $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, in endothelial cells under static condition. Also we could show an interaction und colocalization between $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ and TRPV4. Mechanical stimulation of cells via exposure to continuous shear stress led to a *de-novo* colocalization of $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ with Caveolin-1 and TRPV4. Patch-Clamp measurements of freshly isolated carotid artery endothelial cells (CAEC) from

Caveolin-1^{-/-} mice demonstrated a ~ 45 % reduction of K_{Ca}-mediated potassium currents (-54 % for K_{Ca}2.3 and -40 % for K_{Ca}3.1) when compared to wildtype controls.

In summary, present work provide evidence for a dynamic microcompartmentation of TRPV4/K_{Ca} in caveolae of endothelial cells and highlight the importance of Caveolin-1 for endothelial K_{Ca} functions.

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund: Arterielle Hypertonie

Nach wie vor gehören Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems weltweit zu den Haupttodesursachen. Schon lange ist bekannt, dass vor allem die arterielle Hypertonie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt. Allein im Jahr 2010 starben 9,4 Millionen Menschen an den Folgen einer Hypertonie (Murray & Lopez 2012). Als Hypertonie wird nach dem JNC 7 Report von 1997 eine längerfristige Erhöhung des Blutdrucks auf Werte von über 140 mmHg systolisch bzw. über 90 mmHg diastolisch bezeichnet.

Diesen Grenzwert überschreiten 64 % der Männer und 55 % der Frauen über 50 Jahren (Thefeld 2000). Während im Jahr 2000 etwa 26,4 %, also knapp 972 Mio. Menschen der erwachsenen Weltbevölkerung einen Bluthochdruck hatten, wird für 2025 ein Anteil von 1.560 Mio. Menschen erwartet (Kearney et al. 2005). Die erhöhten Druckbelastungen und Druckamplituden bei einer arteriellen Hypertonie steigern den mechanischen „Stress“ auf das Endothel, speziell in Abschnitten mit Strömungsunregelmäßigkeiten, wie z.B. an Gefäßabgängen (Glagov et al. 1988). Diese chronisch mechanische Belastung führt zu einer Schädigung sowie zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Gefäßwand. Es kommt infolgedessen zum Umbau der Gefäßwand, dem sog. *remodelling*. Insbesondere eine gestörte Endothelfunktion scheint mitverantwortlich für eine pathologisch veränderte Gefäßtonuskontrolle und die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen bei Hypertonie zu sein (Gibbons & Dzau 1994).

1.2 Das vaskuläre Endothel

Das vaskuläre Endothel stellt die zum Lumen gewandte Zellschicht aller Blut- und Lymphgefäße dar. Es besteht aus einer einlagigen, hoch spezialisierten Schicht von ca. 140 µm langen und 7 µm breiten, längsorientierten Endothelzellen, die an die Basallamina, einer spezialisierten extrazellulären Matrix, gebunden sind (Haas & Dulig 1997). Bei den Endothelzellen handelt es sich um bipolare Zellen, die aus dem Mesoderm entstanden sind (Risau & Flamme 1995).

In den 80er Jahren wurde dem Endothel nur eine anatomische Bedeutung als Barriere zwischen Blut und Gewebe zugesprochen. Mit der Zeit haben sich jedoch immer mehr Evidenzen gehäuft, die darauf hinweisen, dass es sich um eine multifunktionale, signaltransduzierende Oberfläche im Gefäßsystem handelt, die an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt ist. Zu den wichtigsten Funktionen des Endothels gehören der selektive Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe (Stevens et al. 2000; Lum & Malik 1994), inflammatorische und immunologische Prozesse, die Regulation einer adäquaten Blutgerinnung (Montgomery & Shi 2012) und die Angiogenese (Tobelem 1990). Weiterhin spielt das Endothel eine wichtige Rolle in der Steuerung des peripheren Widerstandes der Gefäße, also des systemischen Blutdrucks. Es reguliert den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur und trägt so zur Vasodilatation (Sandow et al. 2012) oder Vasokonstriktion bei (Lüscher et al. 1990).

1.2.1 Funktion des Endothels bei der Gefäßtonusregulation

Die adäquate Durchblutung der Organe und die Regulierung des systemischen Blutdruckes werden durch eine an die metabolischen und hämodynamischen Bedürfnisse angepasste Regulation des Gefäßtonus gewährleistet. Der Gefäßtonus wird durch den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) bestimmt und durch hämodynamische Kräfte, wie etwa der Wandschubspannung (*shear stress*) (Coon et al. 2015; Pohl et al. 1986), oder durch zirkulierende humorale Faktoren (Angiotensin II) reguliert. Das Endothel dient dabei als Sensor für diese Reize und vermittelt eine Änderung des Gefäßdurchmessers durch die Synthetisierung und Freisetzung vasokonstriktorischer oder vasodilatatorischer Faktoren (Autakoide).

Die maßgebliche Funktion des Endothels bei der Kontrolle des vaskulären Tonus konnte im Jahr 1980 tierexperimentell bei der durch Acetylcholin-vermittelten Relaxation an isolierten Aorten von Furchgott und Zawadzki gezeigt werden (Furchgott & Zawadzki 1980). Dabei führte die Stimulation des Endothels mit Acetylcholin zu einer Freisetzung eines Faktors mit geringer Halbwertszeit, der die glatte Gefäßmuskulatur relaxieren ließ. Dieser endothelabhängige Vasodilator wurde anfänglich als „*endothelium-derived relaxing factor*“ (EDRF) (Furchgott et al. 1984) bezeichnet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei EDRF um das Gas Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro et al. 1987). Mittlerweile sind zwei weitere endothelabhängige Vasodilatationssysteme bekannt, das Prostazyklin (PGI₂)-System (Moncada et al. 1976) und der „*endothelium-derived hyperpolarizing factor*“ (EDHF)

(Feletou & Vanhoutte 2006). Zu den wesentlichen endothelabhängigen Vasokonstriktoren, die zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur führen, zählen Endothelin-1, Prostaglandin H2 und Thromboxan.

1.2.1.1 Endotheliale Vasodilatoren

Zusammenfassend zählen Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI_2) und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) zu den wichtigsten endothelialen Vasodilatoren als Antwort auf vasoaktive Agonisten und mechanischen Stress (Zhang & Gutterman 2011; Grgic et al. 2009; Brähler et al. 2009; Dora et al. 2003; Coleman et al. 2001) und werden nachfolgend detaillierter beschrieben. In Abbildung 1-1 ist schematisch eine Übersicht über die Funktionen des Endothels bei der Vasodilatation dargestellt.

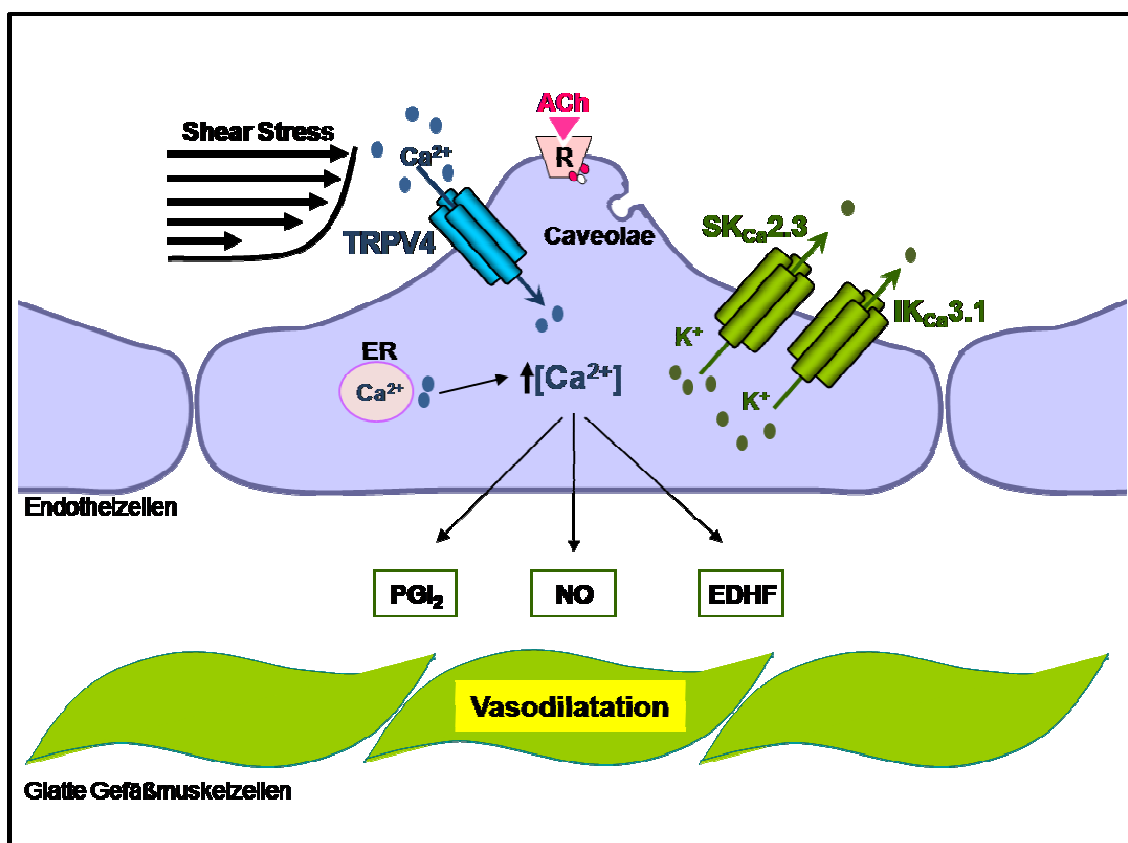


Abbildung 1-1: Das Endothel reguliert die endothelabhängige Vasodilatation.

Schematische Übersicht über die Rolle des Endothels bei der endothelabhängigen Vasodilatation. (ACh) Acetylcholin, (R) Rezeptor, (ER) Endoplasmatisches Retikulum, (PGI_2) Prostazyklin, (NO) Stickstoffmonoxid, (EDHF) *endothelium-derived hyperpolarizing factor*.

1.2.1.2 Stickstoffmonoxid

Einer der wichtigsten Mediatoren der endothelvermittelten Vasodilatation ist das Stickstoffmonoxid (Lundberg et al. 2015; Busse & Flemming 1995; Moncada et al. 1991; Palmer et al. 1987). Neben seiner vasoregulatorischen Wirkung inhibiert es die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und wirkt antithrombotisch, indem es die Thrombozytenadhäsion und -aggregation hemmt.

Die Freisetzung des Stickstoffmonoxids erfolgt aus L-Citrullin, das, katalysiert durch das Enzymsystem der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), aus der Aminosäure L-Arginin hervorgeht (Nathan, 1992; Palmer et al. 1988; Moncada et al. 1976) (Abbildung 1-2). Bei der endothelialen Stickstoffmonoxid-synthase handelt es sich um ein im Endothel konstitutiv expremiertes, an die Membran gebundenes Enzym, dessen Aktivität hauptsächlich durch die Calciumkonzentration reguliert wird (Busse & Flemming 1993; Newby & Henderson 1990; Lüscher 1990). So führt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Aktivierung von eNOS (Pollock et al. 1991). Das Calcium-bindende Protein Calmodulin dient hierbei als Calciumsensors (Bredt & Snyder 1990).

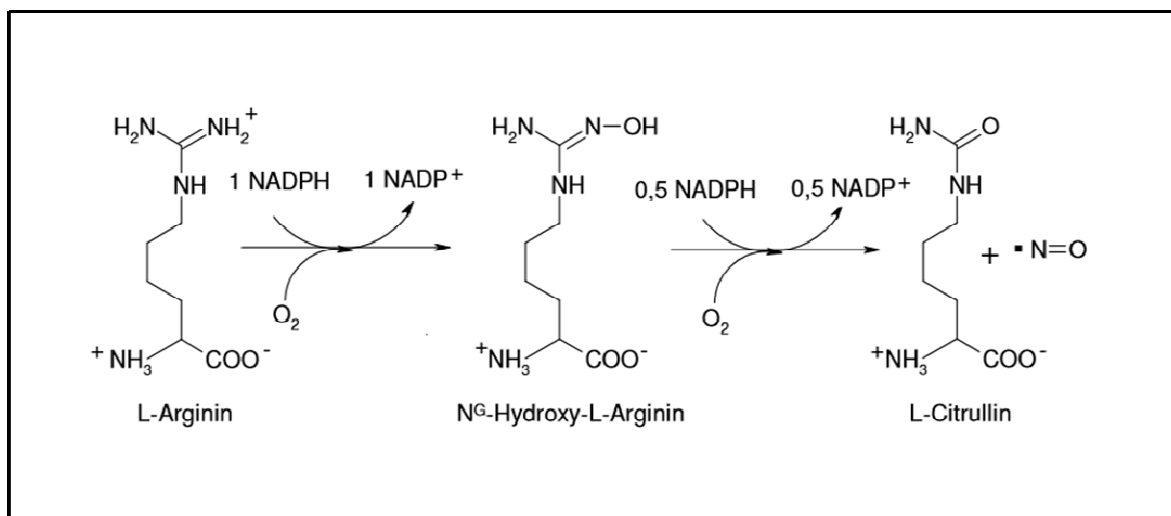


Abbildung 1-2: NO-Synthase-katalysierte Bildung von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin.

Modifiziert nach (1992).

Wird NO vom Endothel an die glatten Gefäßmuskelzellen abgegeben, aktiviert es dort die zytosolische Guanylatzyklase, wodurch vermehrt cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) aus Guanosintrisphosphat (GTP) gebildet wird (Rees et al. 1989, Rapoport et al. 1983). Die anschließende Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase führt zur Phosphorylierung verschiedener Enzymsysteme, die an der

Regulierung der kontraktilen Elemente und des intrazellulären Calciumsspiegels sowie der Stimulierung von Calciumkanälen beteiligt sind (Mackie et al. 1986; MacMillan-Crow et al. 1986). Es kommt zu einer Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration und anschließend zu einer durch K_{Ca} -vermittelten Hyperpolarisation, die zur Relaxation der VSMC mit konsekutiver Vasodilatation führt (Walsh et al. 1995; Hassid 1986).

1.2.1.3 Prostazyklin

Das Prostazyklin wird aus der Arachidonsäure gebildet, welche aus den Membranlipiden durch die Calcium-abhängige Phospholipase A2 freigesetzt wird (Hong & Deykin, 1982). Die Synthese und Freisetzung des Prostazyklins wird durch humorale oder hämodynamische Stimuli reguliert (Frangos et al. 1985; Alhenc-Gelas et al. 1982). Wird PGI_2 von der Endothelzelle sezerniert, bindet es über einen membranständigen Rezeptor an die glatten Gefäßmuskelzellen und erhöht mittels Aktivierung der Adenylatzyklase die intrazelluläre Konzentration von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat). Es kommt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und somit zu einer Vasodilatation. Weiterhin bewirkt Prostazyklin die Freisetzung von Stickstoffmonoxid.

1.2.1.4 Endothelium-derived hyperpolarizing factor

Die Beobachtung, dass es nach pharmakologischer Inhibierung des NO- und Prostazyklinsystems weiterhin zu einer endothelbedingten Vasodilatation in arteriellen Widerstandsgefäßen kommt, führte zu dem Postulat eines weiteren vasodilativ wirksamen endothelialen Systems (Feletou & Vanhoutte 2006b). Weiterführende Untersuchungen in diese Richtung zeigten, dass bei gehemmter NO- und PGI_2 -Produktion die Endothel-induzierte Gefäßrelaxation, immer mit einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen einhergeht. Dieses Phänomen wurde daher einem *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) zugeschrieben (Feletou & Vanhoutte 2006a; Feletou & Vanhoutte 1988; Chen & Suzuki et al. 1988). Die resultierende Hyperpolarisation der Endothel- und Muskelzelle ist auf Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca} -Kanäle) zurückzuführen (Feletou & Vanhoutte 2006b). Anhand von Inhibitionsversuchen Mitte der neunziger Jahre konnte die Beteiligung der unterschiedlichen K_{Ca} -Kanal-Subtypen an der Hyperpolarisation belegt werden. Eine Aktivierung der endothelialen K_{Ca} -Kanäle, insbesondere des *small-conductance* $K_{Ca2.3}$

und des *intermediate-conductance* $K_{Ca3.1}$ Typs, führten zum Kaliumausstrom aus der Endothelzelle (Garland et al. 2011; Feletou & Vanhoutte 2006b; Busse et al. 2002).

Dabei trägt EDHF hauptsächlich in kleineren Arteriolen mit einem Durchmesser von weniger als 500 μm , also den eigentlichen Widerstandsgefäßen, zur Gefäßtonusregulation bei (Shimokawa et al. 1996). Bis heute ist die Beschaffenheit des EDHF noch nicht vollständig identifiziert und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, dass es sich um ein System aus chemischen und elektrischen Prozessen handelt (Brähler et al. 2009; Feletou & Vanhoutte 2006; Jaggar et al. 1998; Urakami-Harasawa et al. 1997), dessen Effekt einem komplexen elektrophysiologischen Zusammenspiel zwischen dem Endothel und der glatten Gefäßmuskulatur zugeschrieben wird.

Bindet Acetylcholin (ACh) an einen muskarinergen G-Protein-gekoppelten ACh-Rezeptor auf der Endothelzelle, kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylbisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diazylglyzerin spaltet. Die Erhöhung der IP_3 -Konzentration führt zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), was eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hat. Kommt es zu einer Stimulation durch hämodynamische Kräfte, so erfolgt eine Aktivierung von Ca^{2+} -selektiven Ionenkanäle, über die Ca^{2+} aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum gelangen kann. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt wiederum zur Aktivierung Calcium-aktivierter Kaliumkanäle (K_{Ca}) und es kommt zum Kaliumausstrom aus dem Zellinneren. Dieser Kationenausstrom aus dem Inneren der Zelle resultiert in einer Hyperpolarisation, d.h. das Zellinnere wird gegenüber dem Extrazellularraum elektrisch negativer. Es gibt vermehrt Hinweise, dass die Hyperpolarisation anschließend über *Gap junctions* an die benachbarten Gefäßmuskelzellen weitergeleitet wird (Busse et al. 2002; Sandow et al. 2002). Vor allem die endothelialen K_{Ca} -Kanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$, scheinen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser durch Hyperpolarisation induzierten Gefäßantwort zu spielen (Brähler et al. 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur besteht in einer direkten Wirkung von K^+ -Ionen an der glatten Gefäßmuskelzelle. So strömen nach Aktivierung der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$, K^+ -Ionen in den intrazellulären Raum zwischen Endothelzelle und glatter Gefäßmuskelzelle, was in einer Erhöhung der Kaliumkonzentration in diesem Kompartiment resultiert. Dies führt wiederum in der Zellmembran der glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase und K_{IR} -Kanälen

(einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanäle) (Edwards et al. 1998). Die Bedeutung der myoendothelialen Kommunikation bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert, da in einigen Blutgefäßen, die eine EDHF-Antwort aufweisen, eine K^+ -induzierte Hyperpolarisation und Relaxation nicht nachgewiesen werden konnten (Feletou 2006; Lacy et al. 2000; Edwards et al. 1999).

Neben NO und PGI_2 bildet das Endothel weitere diffusive Moleküle, welche eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen induzieren und dadurch als Teil des EDHF-Systems in Betracht kommen. Zu diesen Faktoren zählen auch Epoxyeicosatriensäuren (EET), welche in Endothelzellen aus Arachidonsäure gebildet werden (Garland et al. 2011; Feletou & Vanhoutte 2009). Die Freisetzung von EETs wird dabei sowohl durch Mediatoren wie Bradykinin als auch durch mechanische Stimuli, wie Scherkräfte am Endothel stimuliert. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können Epoxyeicosatriensäuren durch die Zellmembran in die glatten Gefäßmuskelzellen diffundieren und dort den Kaliumkanal $K_{Ca1.1}$ aktivieren, was wiederum zur Hyperpolarisation und anschließenden Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (Loot et al. 2012; Dimitropoulou et al. 2007; Archer et al. 2003). Zudem gibt es vermehrt Hinweise, dass EETs die Aktivität von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ und somit die Hyperpolarisation der Endothelzelle beeinflussen könnten. Es ist wahrscheinlich, dass EETs über die Wirkung an endothelialen Ca^{2+} -Kanälen wie etwa den TRPV4-Kanälen, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen und so den Aktivitätszustand von Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanälen modulieren oder über Proteinkinase A und cAMP auf diese Kanäle wirken (Flemming & Busse 2006).

1.3 Rolle von Calcium-Ionen bei der endothelabhängigen Vasodilatation

Calcium reguliert als *second messenger* zahlreiche zelluläre Prozesse und spielt auch in der endothelabhängigen Vasodilatation eine wichtige Rolle (Nilius et al. 2007; Nilius und Droogmans 2001). So beruht die Bildung der vasodilatatorischen endothelialen Faktoren auf einer Ca^{2+} -abhängigen Synthese, wodurch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die Aktivierung endothelialer Ionenkanäle eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung der hämodynamischen und humoralen Vasodilatation spielen (Himmel et al. 1993).

1.3.1 Stimulation des Endothels durch humorale Faktoren

Kommt es zur Stimulation des Endothels durch einen Agonisten wie etwa Bradykinin oder Acetylcholin, resultiert ein biphasischer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der kurze, initiale Anstieg des Calciums (sog. Ca^{2+} -peak) beruht dabei auf einer Inositoltriphosphat-vermittelten Calciumfreisetzung aus Speichern des endoplasmatischen Retikulums (Nilius et al. 1997; Adams et al. 1989). Nach der Bindung des Agonisten an einen membranständigen, G-Protein-gekoppelten-Rezeptor, kommt es durch die nachgeschaltete Signaltransduktion zur Bildung von Inositoltrisphosphat (IP_3). IP_3 bindet anschließend an den IP_3 -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums und es kommt zur Freisetzung von Ca^{2+} . Diese Calciumfreisetzung resultiert in einer schnellen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es folgt eine lang anhaltende Plateauphase der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung, die auf einen Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle beruht (Nilius et al. 2001; Jacob 1990; Schilling et al. 1989).

Für den Ca^{2+} -Einstrom werden in der Literatur verschiedene Kanäle beschrieben. Neben Ca^{2+} -selektiven Kationenkanälen, welche durch Entleerung der Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden (Vaca & Kunze 1994) und Inositoltetraphosphat (IP_4)-regulierten Ca^{2+} -Kanälen (Lückhoff & Clapham 1992; Neher 1992), wurden Ca^{2+} -permeable, nicht-selektive Kationenkanäle beobachtet (Hoyer et al. 1996; Nilius et al. 1993; Popp et al. 1992; Lansmann et al. 1987).

Elektrophysiologisch zeigte sich zudem neben dem Ca^{2+} -Einstrom eine Zellhyperpolarisierung, die auf einen K^+ -Ausstrom mittels Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen (K_{Ca} -Kanäle) zurückzuführen ist (Yamamoto et al. 1999; Vaca et al. 1996; Nilius et al. 1991; Fichtner et al. 1987; Johns et al. 1987). Diese Hyperpolarisation ermöglicht, dass der elektrochemische Gradient innerhalb der Zelle für Calcium erhöht wird und ein lang anhaltender Ca^{2+} -Einstrom gewährleistet ist.

Der Ca^{2+} -Einstrom und die Bildung von NO ist direkt von der Zellhyperpolarisierung abhängig (Lückhoff & Busse 1990). Für die Synthese endothelialer Vasodilatoren ist die Aktivierung endothelialer Ca^{2+} -permeabler Kationen- und Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle somit von entscheidender Bedeutung.

1.3.2 Stimulation des Endothels durch hämodynamische Kräfte

Die Endothelzellen bilden eine mechanische Barriere zwischen dem Blut und dem Gewebe und sind aufgrund ihrer Position *in vivo* hämodynamischen Kräften wie dem

hydrostatischen Druck, den rhythmischen Dehnungskräften und der Wandschubspannung, ausgesetzt (Dobrin et al. 1989).

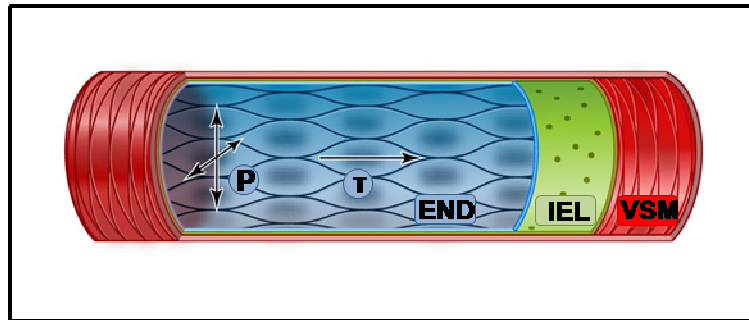


Abbildung 1-3: Auf das Endothel wirkende biomechanische Kräfte

Das Endothel ist durch den Blutfluss verschiedenen biomechanischen Kräften ausgesetzt. Durch Blutdruck und Blutdruckamplitude werden die zirkuläre Wandspannung und rhythmische Dehnungen (P) (Stretch) verursacht. In axialer Richtung wirkt die durch die Blutströmung ausgeübte Wandschubspannung (τ). (END) Endothel, (IEL) Innere elastische Lamina, (SM) Glatte Gefäßmuskulazellen. Modifiziert nach (Lundberg et al. 2015).

Die Regulierung des Gefäßtonus wird neben den zirkulierenden humoralen Faktoren auch durch die Blutflussrate und die mit dem Blutfluss assoziierte Wandschubspannung (*shear stress*) beeinflusst. Somit führt eine Erhöhung des Blutflusses im gesunden Endothel zu einer Vasodilatation (Kuo et al. 1990; Pohl et al. 1986; Busse et al. 1985) und schützt auf diese Weise das Endothel vor mechanischer Schädigung und gewährleistet zeitgleich eine adäquate Blutversorgung nachfolgender Gewebe und Organe (Hoyer 1997; Davies 1995).

Bis heute ist die Signaltransduktion nach hämodynamischer Stimulation noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist jedoch, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivierung von Ionenkanälen eine entscheidende Rolle spielen (Himmel et al. 1993). Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nach hämodynamischer Wandschubspannung konnte sowohl als *in vitro* Stimulation von Endothelzellen (Mendoza et al. 2010; Hartmannsgruber et al. 2007; Köhler et al. 2006; Hoyer et al. 1998), als auch an isolierten Gefäßen beobachtet werden (Falcone et al. 1993). Eine Erhöhung des Blutflusses führt einerseits zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Köhler et al. 2006; Falcone et al. 1993; Shen et al. 1992) und bewirkt andererseits Ca^{2+} -Oszillationen (Sonkusare et al. 2012; Shen et al. 1992; Nelson et al. 1995).

Zudem wurde beobachtet, dass ein Ca^{2+} -Einstrom durch spezielle mechanosensitive Kationenkanäle (MSC) mit einer konsekutiven Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären IP_3 - (Nollert et al. 1990) und aus Ryanodin-sensitiven Speichern (Hoyer et al. 1998)

wichtig ist. Auf Zellmembranebene wurden die mechanosensitiven Kationenkanäle in Endothelzellen *in vitro* (Nilius et al. 2001; Lansman et al. 1987) und *in situ* (Hoyer et al. 1997) als Dehnungs-aktivierbare Kanäle (*stretch-activated channels*, SAC) identifiziert. Über lange Jahre war die molekulare Identität, d.h. die MSC/SAC-kodierende Gene wie auch entscheidende molekulare Determinanten der Mechanosensitivität, nicht geklärt. Heute nimmt man an, dass Kationenkanäle der TRP-Genfamilie mechanosensitive Eigenschaften besitzen und somit Dehnungs-aktivierte MSC sein könnten (Liedtke & Kim 2005; Maroto et al. 2005).

1.4 Nicht-selektive Kationenkanäle

Bei den *transient receptor potential* (TRP-)Kanälen handelt es sich um eine Familie von nicht selektiven Kationenkanälen, die für die quantitativ dominierenden Kationen Natrium und Kalium sowie die bivalenten Kationen wie Magnesium und Calcium permeabel sind. Sie werden in nahezu allen Geweben und Zelltypen exprimiert und spielen eine große Rolle bei der Regulation verschiedenster Zellfunktionen (Nilius et al. 2007). Es gibt vermehrt Hinweise, dass endotheliale TRP-Kanäle eine entscheidende Funktion bei der Transzytose, Endozytose, Angiogenese und Endothelzellproliferation spielen (Nilius & Droogmans 2001) und ebenso wie die an der glatten Gefäßmuskulatur lokalisierten TRP-Kanäle wesentlich zur Regulation des Gefäßtonus beitragen (Yao & Garland 2005).

1.4.1 Die Familie der TRP-Kanäle

Die Bezeichnung *transient receptor potential* ist auf die Entdeckung einer *Drosophila melanogaster*-Mutante zurückzuführen, die statt mit einem plateauförmigen mit einem transienten Signal auf einen Lichtreiz reagierte (Wong et al. 1989; Montell & Rubin 1989). Das zugrunde liegende TRP-Protein, welches in Photorezeptorzellen der Fruchtfliege exprimiert wird, bildet mit dem Strukturprotein INAD, zwei zu TRP homologe Kanäle TRP γ und TRPL (*TRP-like*) (Phillips et al. 1992), der Phospholipase C β , Rhodopsin, Calmodulin und der augenspezifischen Proteinkinase C (Pedersen et al. 2005) einen Proteinkomplex, der den Lichtreiz in eine Depolarisation der Zelle umwandelt.

Bis heute sind 39 verschiedene TRP-Proteine bekannt, 28 davon wurden in Säugetieren identifiziert, fünf in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), drei im Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und eins im Zebrafisch (*Danio rerio*). Aufgrund von Strukturhomologien gliedern sich die TRP-Protein der Säugetierisoformen in 6 Subfamilien: die Canonical bzw. Classical- (TRPC), Vanilloid- (TRPV), Melastatin- (TRPM), Mucolipin- (TRPML), Ankyrin- (TRPA) und Polycystin- (TRPP) Subfamilie (Nilius et al. 2007; Pedersen et al. 2005; Montell et al. 2002). Die *no mechanoreceptor potential C* (Nichtmechanorezeptor)-Subfamilie (TRPN) wurde bislang nur in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* und *Danio rerio* nachgewiesen (Pedersen et al. 2005).

Übereinstimmend haben die TRPs einen intrazellulären N- und C-Terminus, sowie sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Die Poren-bildende-Region, *pore loop*, befindet sich zwischen der fünften und sechsten Domäne (Voets et al. 2004), deren Aminosäuren die Selektivität und Leitfähigkeit der jeweiligen Kanäle bestimmt. Je vier dieser Kanaluntereinheiten bilden ein Homo- oder Heterotetramer, wobei Heterotetramere wahrscheinlich nur mit Subtypen der eigenen Unterfamilie gebildet werden (Abbildung 1-4) (Song & Yuan 2010).

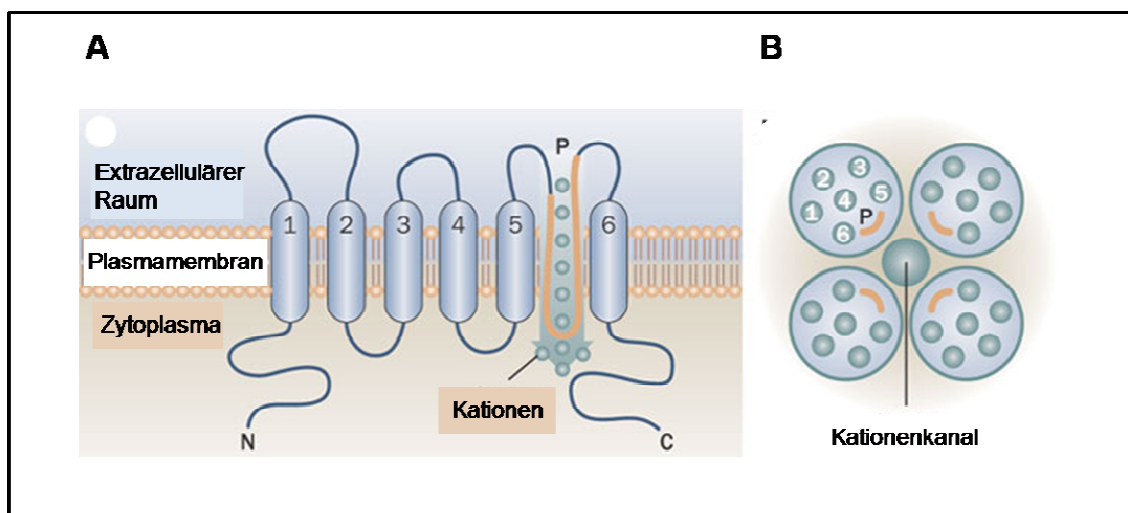


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der postulierten Domänenstruktur der TRP-Kanäle.

(A) Schematische Darstellung der 6 Transmembrandomänen S1-S6 mit einer putativen Porenregion (P) zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. (B) Vier transient receptor potential Monomere bilden einen funktionellen Kationenkanal. Modifiziert nach (Woudenberg-Vrenken et al. 2009).

Eines der wichtigsten strukturellen Elemente der TRPC-, TRPV-, TRPM- und TRPN-Unterfamilie ist die TRP-Box, wobei das Motiv bei den TRPVs nicht so stark konserviert ist. Es handelt sich um ein aus sechs Aminosäuren bestehendes Motiv (EWKFAR). Die

genauen Funktionen dieser TRP-Box sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Übersicht über die strukturellen Einheiten der 7 TRP-Subfamilien ist in Abbildung 1-5 dargestellt.

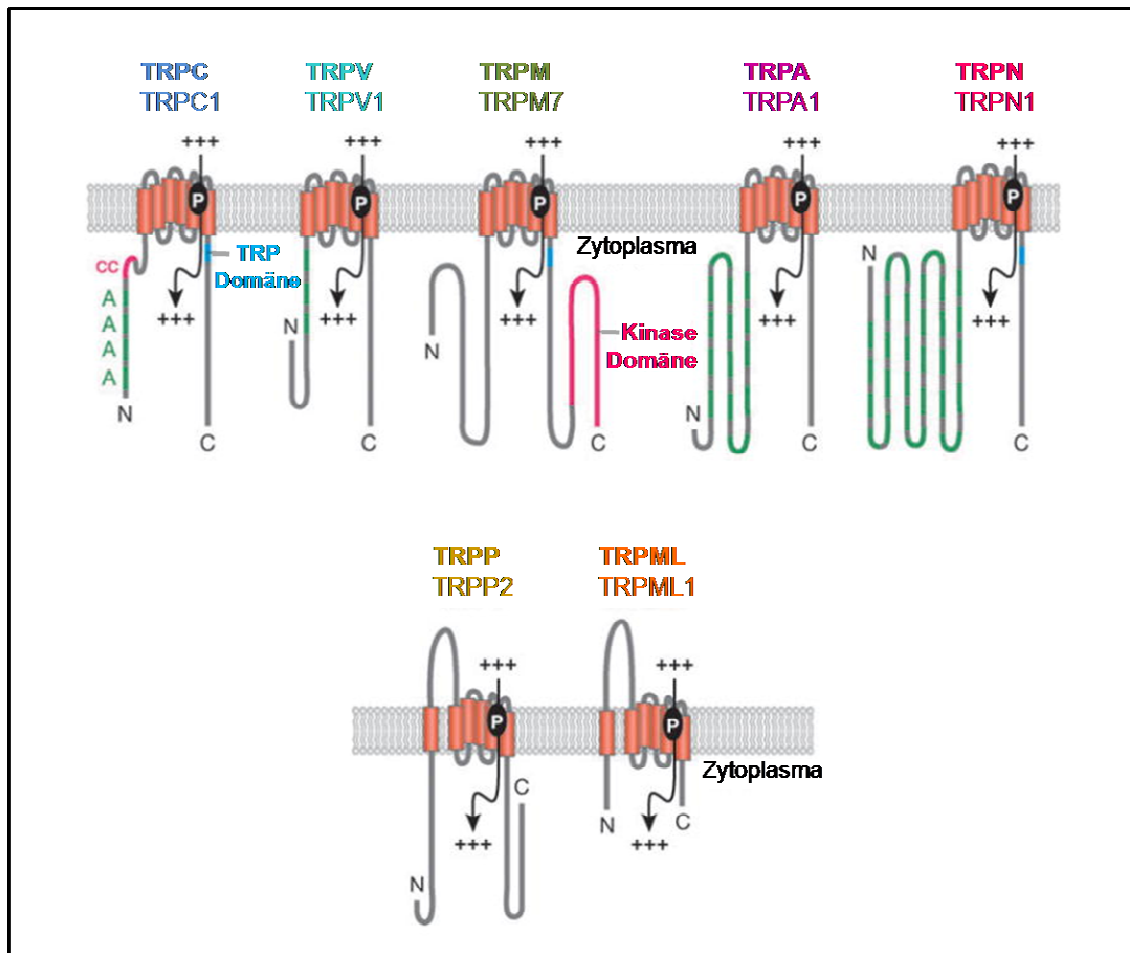


Abbildung 1-5: Übersicht über die Strukturen der *Transient-receptor-potential* –Subfamilien.

Alle TRP-Kanaluntereinheiten enthalten 6 Transmembransegmente (S1-S6) mit einer putativen Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment. Modifiziert nach (Giamarchi et al. 2006).

Es gibt vermehrt Hinweise, dass die TRP-Box der TRPCs in Vertebraten gemeinsam mit weiteren Aminosäuren des C-Terminus eine Funktion beim speicher-vermittelten reguliertem Ca^{2+} -Einstrom (SOCE; *store operated Ca2+-entry*) spielt (Singh et al. 2000). Für TRPV1 wurde gezeigt, dass die TRP-Box an der Assemblierung der Tetramere beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der Kanalöffnung spielt (Valente et al. 2008; Garcia-Sanz et al. 2004). Für TRPM8 gibt es Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung der TRP-Box mit PIP2 (Rohacs et al. 2005).

Des Weiteren gibt es Gemeinsamkeiten bei den Protein-Protein-Interaktionsmotiven in der C- und N-terminalen Region, wie PDZ-Domänen und Ankyrin-Repeats oder auch Calmodulin-Bindestellen (Liedtke et al. 2007).

TRP-Kanäle werden über verschiedene Mechanismen reguliert, wie z.B. über Ligandenbindung, Tyrosinkinasen- oder G-Proteinaktivierung. Einige TRP-Kanäle können jedoch auch direkt aktiviert werden, etwa durch Temperaturänderungen, Osmolarität oder mechanische Reize.

1.4.2 TRP-Vanilloid-Subfamilie und der TRPV4-Kanal

Die Vanilloid-Rezeptor-Familie wurde nach dem Vanilloid-Rezeptor 1 (Caterina et al. 1997) benannt und besteht in Säugern aus sechs Mitgliedern, die auf Basis ihrer Sequenzhomologie, Funktionen und Ca^{2+} -Selektivität in zwei Gruppen unterteilt werden: TRPV1 bis 4 und TRPV5/6 (Wu et al. 2010). Bei TRPV1 bis TRPV4 handelt es sich um Ionenkanäle, die nicht-selektiv für Ca^{2+} und nur gering permeable für Na^+ sind ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ zwischen 1 und 10). Zudem sind sie etwa durch positive Temperaturveränderungen aktivierbar (Voets et al. 2004) und wirken als Sensoren für eine Vielzahl synthetischer und endogener Liganden sowie physikalischer Reize, wie etwa die Erhöhung der Wandschubspannung (Vriens et al. 2009; Hartmannsgruber et al. 2007). Dabei können die verschiedenen chemischen und physikalischen aktivierenden Stimuli einen additiven oder super-additiven Effekt auf die Steuerung der TRPV-Kanäle haben (Nilius et al. 2005). TRPV5 und TRPV6 sind die am höchsten selektiven TRP-Kanäle für Ca^{2+} (Voets et al. 2004).

Der TRPV4-Kanal gehört zu den osmo- und mechanosensitiven Calciumkanälen. Der TRPV4-Kanal-Komplex besteht aus vier Untereinheiten, die ausschließlich Homotetramere bilden. Eine einzelne TRPV4-Untereinheit besteht aus 871 Aminosäuren (Delany et al. 2001) und ist durch sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und die intrazellulären C- und N-terminalen Enden gekennzeichnet. Die selektive Pore wird durch den sogenannten *pore loop* gebildet und liegt zwischen den Domänen S5 und S6. In Säugerzellen ist der TRPV4 ein für Kalzium selektiver Ionenkanal ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 6$) (Watanabe et al. 2008; Liedtke et al. 2000; Wissenbach et al. 2000). Charakteristisch für den TRPV4-Kanal sind die sechs Ankyrin-Wiederholungsdomänen (ANK) am N-terminalen Ende (Plant & Strotmann 2007), deren Sequenz zur Bestimmung der Verwandtschaften verwendet wird (Verma et al. 2010). Es wird vermutet, dass diese Ankyrin-Repeats für die Protein-Protein-Interaktion zwischen Kanal und Cytoskelett oder zwischen mehreren Kanälen verantwortlich sind (Erler et al.

2004). So geht man aktuell davon aus, dass die Ankyrin-domänen für eine korrekte Translokation des Proteins vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran verantwortlich sind und die Assemblierung der Monomere regulieren (Verma et al. 2010; Hellwig et al. 2005; Erler et al. 2004). Für die Mechanosensitivität des TRPV4-Kanals scheint vor allem die prolinreiche Region innerhalb der ersten Ankyrin-Wiederholungsdomäne wichtig zu sein (Everaerts et al. 2010).

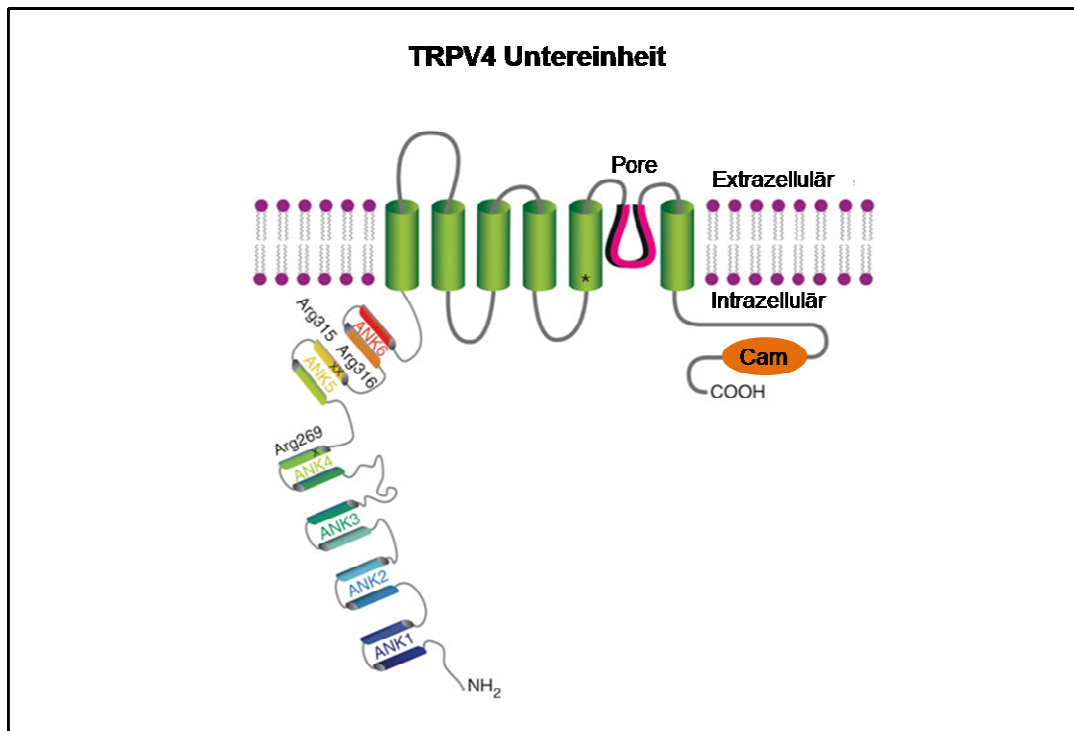


Abbildung 1-6: Der TRPV4-Kanal innerhalb der Zellmembran.

Abgebildet sind die sechs Transmembrandomänen (grün), das zytoplasmatische, aminotermale Ende, die sechs Ankyrinwiederholungsdomänen, die Porenschleife zwischen dem fünften und sechsten Segment (magenta), sowie die Calmodulin Bindungsdomäne (Cam) am carboxyterminalen Ende. Modifiziert nach (Auer-Grumbach et al. 2010).

Die Expression des TRPV4 konnte in den unterschiedlichsten Geweben wie dem zentralen Nervensystem, den Organen der Peripherie wie Lunge, Niere und dem Herzkreislaufsystem nachgewiesen werden. Dabei wird TRPV4 nicht nur vom Endothel sondern auch vom Epithel der Atemwege und des autonomen Nervensystems exprimiert (Troidl et al. 2008; Kwan et al. 2007; Liedtke et al. 2000). Anhand des heterogenen Expressionsmusters des TRPV4-Kanals lässt sich vermuten, dass der Kanal an einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen und Organfunktionen beteiligt ist und durch diverse physikalische und chemische Reize stimuliert werden kann. So erfolgt eine Aktivierung durch Temperaturen $> 24^{\circ}\text{C}$, wodurch der Kanal bei

Körpertemperatur konstitutiv aktiv ist. Es liegt nahe, dass der TRPV4-Kanal eine Rolle bei der Wärmeempfindung und der Temperaturregulation spielt. Zudem ist er hochsensitiv gegenüber extrazellulären Osmolaritätsänderungen im Rahmen physiologischer Osmolaritätsschwankungen. In isotonischem Medium etwa ist TRPV4 aktiv, hypotonische Bedingungen steigern die Kanalaktivität und unter hypertonen Konditionen bleibt die intrazelluläre Kalziumkonzentration konstant oder sinkt ab. Als Osmorezeptor ist TRPV4 z.B. in humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Atemwege, im wasserdurchlässigen Segment des Nephrons und in nozizeptiven Afferenzen peripherer Nerven bedeutungsvoll (Wissenbach et al. 2000; Strotmann et al. 2000; Liedtke et al. 2000).

Eine Mechanosensitivität des TRPV4-Kanals wurde unter anderem in renalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen. Auch in kultivierten Endothelzellen und in intakten Gefäßen konnten ähnliche Calciumsignale in Abhängigkeit von erhöhtem Fluss beobachtet werden. Jedoch ist bislang der vollständige Mechanismus der TRPV4-abhängigen Prozesse nicht vollständig geklärt (Köhler et al. 2006; Hoyer et al. 1998; Falcone et al. 1993; Helmlinger et al. 1991). Neben mechanischem Stress, Osmolarität und Hitze reagiert TRPV4 sensibel auf chemische Verbindungen wie 4 α -Phorbol-12,13-Didecanoate (4 α PDD) (Vriens et al. 2007). An Endothelzellen, die aus der Aorta der Maus isoliert wurden, konnte gezeigt werden, dass 4 α PDD einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Einstromen extrazellulärer Calciumionen induziert. Die Bindungsdomäne für Phorbolsterderivate ist am N-Terminus des S3-Segmentes lokalisiert, was die Latenzzeit zwischen 4 α PDD-Applikation und Wirkungsbeginn sowie ein verzögertes *wash-out* erklären (Vriens et al. 2009; Vriens et al. 2004). TRPV4 reagiert ebenfalls auf inflammatorische Stoffe wie Arachidonsäure, Epoxyeicosatriensäure und Anandamide. Wie alle Mitglieder der TRPV-Familie wird auch TRPV4 durch das polykationische Molekül Ruthenium-Rot (RuR), welches extrazellulär an die Kanalpore bindet, blockiert (Galizia et al. 2012; Watanabe et al. 2003).

Der TRPV4 wurde von Nilius und seinen Mitarbeitern erstmalig in Endothelzellen von Mäuse-Aorten identifiziert (Watanabe et al. 2002; Voets et al. 2002). Bis heute ist die Rolle des TRPV4-Kanals bei der Endothelfunktion nicht vollständig geklärt (Köhler & Hoyer 2007). Es wird vermutet, dass seine funktionelle Bedeutung in Zusammenhang mit der relativ hohen Ca²⁺-Permeabilität steht (Watanabe et al. 2002; Strotmann et al. 2000). Die Aktivierung des TRPV4-Kanals resultiert in einem signifikanten Ca²⁺-Einstrom, der als Antwort auf eine rezeptormediierte oder mechanische Stimulation eine Schlüsselfunktion für eine Vielzahl endothelialer Funktionen spielt. Es konnte

gezeigt werden, dass seine Funktion als Mechanosensor eine bedeutende Rolle bei der Schubspannungs-induzierten Vasodilatation spielt (Everaerts et al. 2010; Hartmannsgruber et al. 2007). Bei der humoralen und hämodynamischen Stimulation des Endothels spielen neben der Aktivierung der Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle auch die Co-Aktivierung von Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}) für den Ca^{2+} -Einstrom eine wichtige Rolle.

1.5 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind Proteine in der Zellmembran, die den Durchfluss von K^+ -Ionen ermöglichen und zu den häufigsten und vielfältigsten aller bisher bekannten Ionenkanäle gehören. Sie werden in nahezu allen erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert und bilden somit eine nahezu ubiquitär vorkommende Familie von Membranproteinen, welche an einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind. So sind Kaliumkanäle an der Kontrolle des Membranruhepotentials, der Steuerung der Sekretion von Hormonen, der Regulation elektrischer Erregbarkeit von Neuronen und deren synaptischen Plastizität beteiligt (Rudy 1988). Ihre Aktivität wird durch Änderungen des Membranpotentials, durch Transmitter, Hormone und durch Zellmetabolismus reguliert (Hille 1978).

Das Hauptmerkmal zur Unterscheidung der verschiedenen Kaliumkanäle ist ihr Öffnungs- bzw. Aktivierungsmechanismus. Bei den spannungsabhängigen Kanälen, wie sie in erregbaren Zellen zu finden sind, führt eine Depolarisation der Zellmembran zur Kanalaktivierung. Bei den spannungsunabhängigen Kanälen hingegen führt die Bindung eines Liganden, wie die Bindung von intrazellulärem Ca^{2+} , zur Konformationsänderung der Proteinstruktur und somit zur Kanalöffnung.

Die K_{Ca} -Kanäle können das Endothel hyperpolarisieren und stellen die elektrochemische Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom bereit und halten den elektrochemischen Gradienten aufrecht.

1.5.1 Die Familie der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle

Die verschiedenen K_{Ca} -Kanäle unterscheiden sich hinsichtlich der Einzelkanalleitfähigkeit, Aktivierungsmechanismen und Verteilungsmuster in den verschiedenen Zelltypen und Geweben und wurden erstmalig in Erythrozyten

beschrieben (Gardos 1958). Die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle werden nach der neuesten Nomenklatur von IUPHAR in die 6TM/1P (6 Transmembrandomänen/ 1 Porendomäne) Familie eingeordnet und kann hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit in 3 Unterklassen unterteilt werden: BK_{Ca} -, SK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle (Guéguinou et al. 2014).

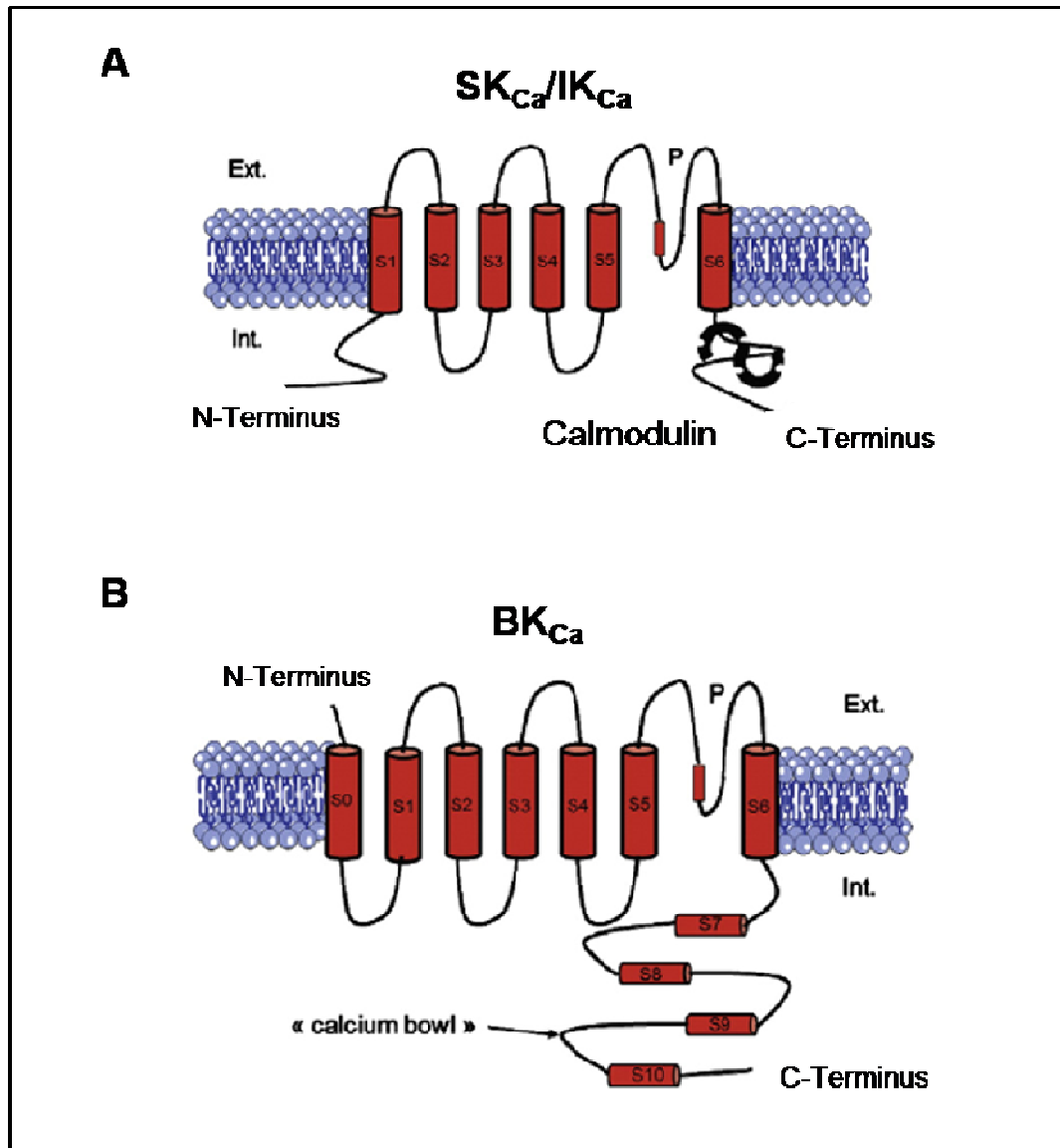


Abbildung 1-7: Die K_{Ca} -Kanäle werden in drei Gruppen unterteilt: BK_{Ca} -, SK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle.

(A) SK_{Ca} - und IK_{Ca} - Kanäle sind spannungsunabhängige und Calmodulin-regulierte K_{Ca} -Kanäle mit geringer und mittlerer Leitfähigkeit, zu denen $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ zählen. (B) Zu den spannungsabhängigen regulierten BK_{Ca} -Kanälen gehören $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}5.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}4.2}$. Modifiziert nach (Guéguinou et al. 2014).

Zu den SK_{Ca} -Kanälen gehören die spannungsunabhängigen und Calmodulin-regulierten K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit, zu denen $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ zählen (Wei et al. 2004). Ebenfalls spannungsunabhängigen und Calmodulin-reguliert

ist der $K_{Ca}3.1$ -Kanal, der aufgrund seiner mittleren Leitfähigkeit zu der Unterklasse der IK_{Ca} -Kanäle zählt. Zu der Unterklasse der BK_{Ca} -Kanälen werden die spannungsabhängig regulierten K_{Ca} -Kanäle $K_{Ca}1.1$, $K_{Ca}5.1$, $K_{Ca}4.1$ und $K_{Ca}4.2$ gezählt (Gutman et al. 2003).

Jeweils vier Untereinheiten bilden den tetrameren K^+ -leitenden Kanalkomplex. Gemeinsam ist diesen Ionenkanälen die Aktivierung durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wobei $K_{Ca}3.1$ und $K_{Ca}2.3$ Calmodulin als Ca^{2+} -Sensor verwendet, während $K_{Ca}1.1$ in der Proteinstruktur eine eigene Ca^{2+} -Bindungsstelle aufweist (Guéguinou et al. 2014; Ledoux et al. 2006). Die K_{Ca} -Kanäle kommen in einer Vielzahl von Geweben und Organen vor, einige Vertreter auch im kardiovaskulären System, endokrinen Gewebe und dem Nervensystem (Ledoux et al. 2006; Vergara et al. 1998).

1.5.2 Der $K_{Ca}3.1$ -Kanal (IK , *intermediate conductance*)

Der $K_{Ca}3.1$ -Kanal, nach der alten Nomenklatur als IK (*intermediate conductance*) oder $SK4$ (*small conductance 4*) bezeichnet, wurde von Gardos erstmalig im Jahr 1958 in Erythrozyten beschrieben (Gardos 1958). Der Kanal trägt dort zur Regulation des Zellvolumens und des Membranpotentials bei. Anhand von Patch-Clamp Versuchen konnte 26 Jahre später gezeigt werden, dass die Aktivierung eines K^+ -Kanals für diese Regulation verantwortlich war (Grygorczyk & Schwarz 1983).

Der funktionelle Kanal besteht aus einem Homotetramer und jede Untereinheit besitzt sechs Transmembrandomänen. Der N- und C-Terminus liegt intrazellulär und die K^+ -selektive Pore liegt zwischen den Segmenten S5 und S6.

$K_{Ca}3.1$ -Kanäle sind leicht einwärts-rektifizierend und zeigen keine Spannungsabhängigkeit. Physiologisch werden sie durch einen IP_3 -vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert. Das Protein Calmodulin (CaM), welches an den proximalen C-Terminus jeder Untereinheit gebunden ist, bildet eine hochsensitive Detektionstelle für Ca^{2+} . Zur Öffnung des Kanals muss es zur CaM-induzierten Konformationsänderung an allen vier Untereinheiten kommen (Fanger et al. 1999). Die Ca^{2+} -Konzentration, bei der die Hälfte der Kanäle geöffnet sind (EC_{50}), liegt bei etwa 250 nM. Nach der Aktivierung des Kanals kommt es zum K^+ -Ausstrom, der in einer Hyperpolarisation der Zelle resultiert. Die Einzelkanalleitfähigkeit des $K_{Ca}3.1$ -Kanals liegt bei 30-80 pS (Ishii et al. 1997; Logsdon et al. 1997).

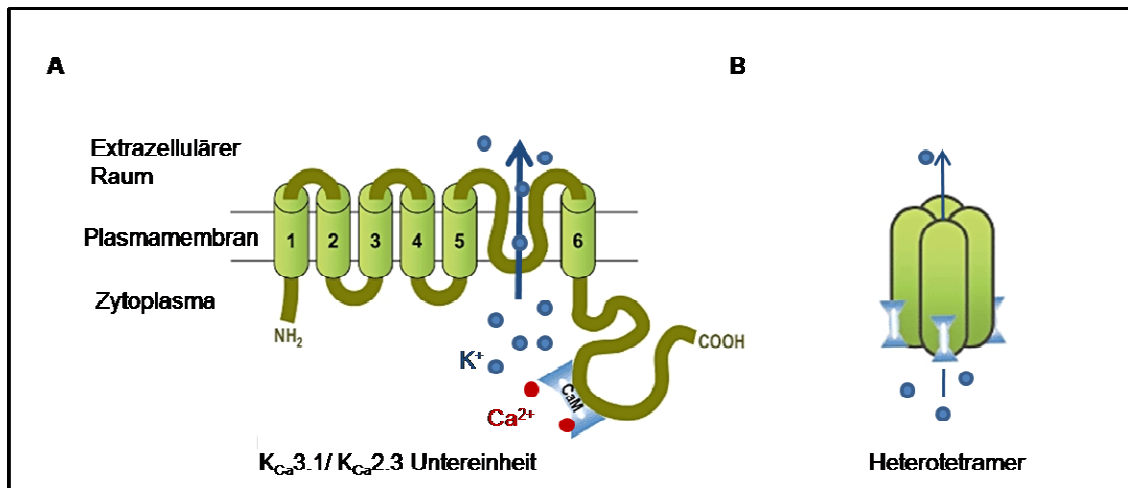


Abbildung 1-8: Schematischer Aufbau von K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3.

(A) Schematischer Aufbau einer α-Untereinheit des K_{Ca}3.1/2.3. Schematische Darstellung der 6 Transmembrandomänen S1-S6 mit einer putativen Porenregion zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Calmodulin (CaM) stellt den Calciumsensor dar. (B) Vier K_{Ca}3.1 bzw. K_{Ca}2.3 Monomere bilden einen funktionellen Kationenkanal. Modifiziert nach (Grgic et al. 2009).

Der Kanal wird neben dem Gefäßendothel in T-Lymphozyten (Wulf et al. 2000), Fibroblasten (Pena & Rane 1999), Erythrozyten (Gardos 1958) und Leberzellen (Joiner et al. 1997) sowie Lungen- und Placentagewebe (Logsdon et al. 1997) exprimiert. An T-Zellen konnte seine Funktion bei der Regulation immunologischer Prozesse gezeigt werden, in aktiven T-Zellen ist die Expression des Kanals gegenüber der ruhenden Zellen deutlich erhöht. Eine Stimulation der Zellen mit Aktivatoren der Proteinkinase C (Phorbol ester) und der intrazellulären Calcium-Kaskade (Ionomycin) führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Kanalexpression und zeigt die Bedeutung dieser beiden Signalwege für die Immunantwort (Ghanshani & Wulff et al. 2000). Weitere Untersuchungen zeigen, dass K_{Ca}3.1 an der Kontrolle der Proliferation der Endothelzellen und Fibroblasten beteiligt ist und Auswirkungen auf die Angiogenese hat. Die Expression des K_{Ca}3.1-Kanals wird durch die Wachstumsfaktoren bFGF (*fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die das Wachstum von Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren, erhöht.

Die Rolle des K_{Ca}3.1 in der Angiogenese konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden. Durch die vermittelte Hyperpolarisation und die damit einhergehende Steigerung der elektrochemischen Triebkraft für den Ca²⁺-Einstrom spielt der K_{Ca}3.1-Kanal eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Fibroblasten und Endothelzellen (Köhler et al. 2000). Im Jahr 2005 zeigten Grgic und Mitarbeiter, dass eine Stimulation mit FGF und VEGF zu einer signifikanten Hochregulation der Expression des K_{Ca}3.1 in Endothelzellen führt und es zu einer ausgeprägten Fibroblasten- und

Endothelzellproliferation kommt (Grgic et al. 2005). Eine Blockierung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals mit für diesen Kanal spezifischen Blockern Clotrimazol und TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole) führte zur Unterdrückung der Proliferation. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von TRAM-34 die Restenose nach Ballonkatheterisierung der *A. carotis* in der Ratte inhibierbar ist, was somit potentielle neue Therapieverfahren bei kardiovaskulären Erkrankungen ermöglichen könnte (Köhler et al. 2003).

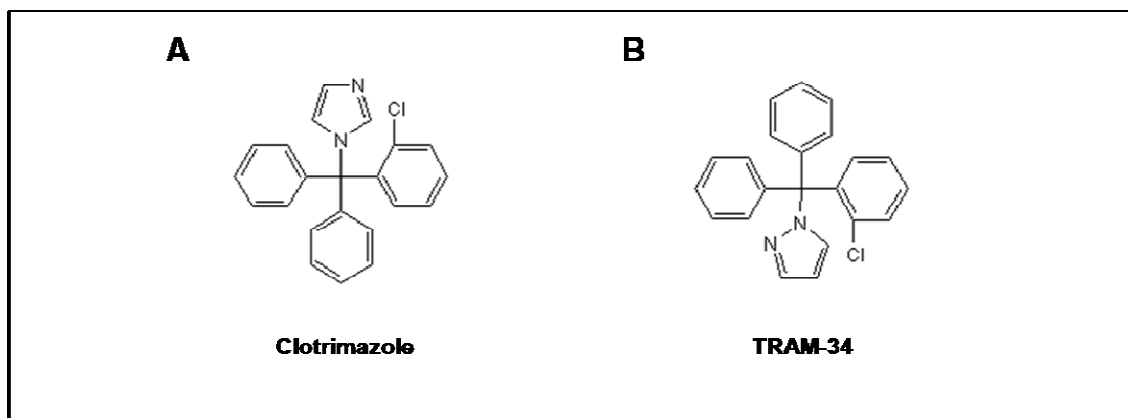


Abbildung 1-9: Clotrimazol und sein Derivat TRAM-34 bilden spezifische Blocker für $K_{Ca3.1}$.

(A) Strukturformel von Clotrimazol. (B) Strukturformel von TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)-diphenylmethyl]-1H-pyrazole).

Der $K_{Ca3.1}$ wird durch die Benzimidazolinone 1-Ethyl-2-benzimidazolinon (1-Ebio) und dessen potenteren Derivat 5,6-Dichloro-1-ethyl-2-benzimidazolinon (DC-EBIO) aktiviert, da diese Substanzen die Öffnungszeit nach Kanalaktivierung beträchtlich verlängern (Singh et al. 2001; Syme et al. 2000).

1.5.3 Der $K_{Ca2.3}$ -Kanal (SK, *small-conductance*)

Der $K_{Ca2.3}$ -Kanal gehört zu den Calcium-aktivierten Kaliumkanälen mit einer niedrigen Leitfähigkeit (daher auch als SK, „*small-conductance*“, bezeichnet) und zeigt eine Einzelleitfähigkeit von 4-14 pS. Ähnlich wie $K_{Ca3.1}$ ist der $K_{Ca2.3}$ hoch Ca^{2+} -sensitiv und wird bereits bei Konzentrationen von 300-700 nM halbmaximal aktiviert. Der $K_{Ca2.3}$ zeigt eine etwa 50 %-ige genetische Homologie zu $K_{Ca3.1}$ und entspricht dessen Aufbau weitestgehend.

Die K_{Ca} -Kanäle niedriger Leitfähigkeit sind ebenfalls spannungsunabhängig und bestehen aus sechs konservierten Transmembrandomänen mit einem intrazellulären

C- und N-Terminus. Am C-terminalen Ende jeder der vier Untereinheiten ist, analog zum $K_{Ca3.1}$, CaM als Ca^{2+} -Sensor gebunden (Abbildung 1-8) (Stocker 2004).

Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Kanäle sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1: Vergleich von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$. Modifiziert nach (Ledoux et al. 2006).

	$K_{Ca3.1}$	$K_{Ca2.3}$
Untereinheiten	Sechs Transmembrandomänen (S1-S6) Homotetramer	
Gene	KCNN4 ($K_{Ca3.1}$)	KCNN3 ($K_{Ca2.3}$)
EC ₅₀	ungefähr 250 nM Ca^{2+}	
Calcium-Sensitivität	über Calmodulin	
Leitfähigkeit	30-80 pS	4-14 pS
Spannungsabhängig	nein	
Spezifische Aktivatoren	1-EBIO/ DC-EBIO Riluzol Chlorzoxazon	
Spezifische Blocker	TRAM-34 Chardotoxin Clotrimazole TEA+	Apamin UCL 1684 Bicucullin TEA+ Dequalinium

Der $K_{Ca2.3}$ wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Im zentralen Nervensystem scheint er einige Krankheiten mit zu verursachen, wie etwa Schizophrenien und bipolare Störungen (Cardno et al. 1999; Chandy et al. 1998) *Anorexia Nervosa* (Koronyo-Hamaoui et al. 2002) sowie *Ataxien* (Figueroa et al. 2001). Im Endothel ist $K_{Ca2.3}$ für die endothelabhängige Vasoregulation von großer Bedeutung. Bei der

EDHF-vermittelten Vasodilatation spielt er mit dem bereits genannten $K_{Ca3.1}$ (IK_{Ca}) eine wichtige Rolle, da beide Kanäle durch ihre K^+ -Leitfähigkeit für die initiale Hyperpolarisation der Endothelzelle mit darauf folgender Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich sind (Grgic et al. 2009). So konnte experimentell gezeigt werden, dass die EDHF-Antwort durch Kombination der Inhibitoren von $K_{Ca2.3}$ (Apamin, UCL 1684) und $K_{Ca3.1}$ (TRAM-34, Charybdotoxin) gehemmt wird, womit die zentrale Bedeutung dieser Ionenkanäle deutlich wird.

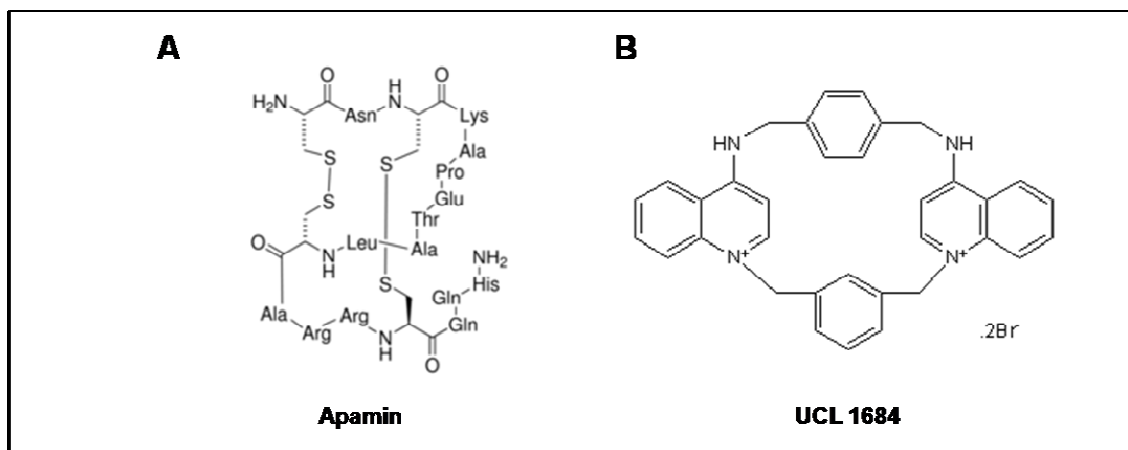


Abbildung 1-10: Apamin und UCL1684 bilden spezifische Blocker für $K_{Ca2.3}$.

(A) Strukturformel von Apamin. (B) Strukturformel von UCL 1684 (6,10-Diaza-3(1,3)8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-Diquinolinacyclodecaphan).

Zur Untersuchung der Funktion des $K_{Ca2.3}$ -Kanals können eine Vielzahl an Inhibitoren und Aktivatoren eingesetzt werden. Neben dem Bienengift Apamin stehen sehr selektive Non-Peptid-Blocker wie etwa UCL 1684 (6,10-Diaza-3(1,3)8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-Diquinolinacyclodecaphan) zur Verfügung (Rosa et al. 1998; Burgess et al. 1981). Ebenso wie $K_{Ca3.1}$ kann auch $K_{Ca2.3}$ durch die Benzimidazole 1-EBIO und dessen potenteres Derivat DC-EBIO effektiv aktiviert werden (Singh et al. 2001; Syme et al. 2000).

1.6 Die Caveolae

Der Nobelpreisträger George Emil Palade beschrieb im Jahr 1953 erstmalig mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen morphologisch distinkte Plasmamembran-Invaginationen in der Endothelzelle (Palade 1953). Zwei Jahre später konnte Yamada

ähnliche Strukturen („*little caves*“) im Gallenblasenepithelium nachweisen (Yamada 1955). Seither wurden diese als Caveolae bezeichneten Strukturen, mit wenigen Ausnahmen wie z.B. Lymphozyten (Fra et al. 1995), in den meisten Zelltypen beschrieben.

Bei den Caveolae handelt es sich um 50-100 nm große Einstülpungen der Plasmamembran. Bis zum Jahr 2010 wurde die Form der Caveolae als Omega- Form beschrieben (Abbildung 1-11).

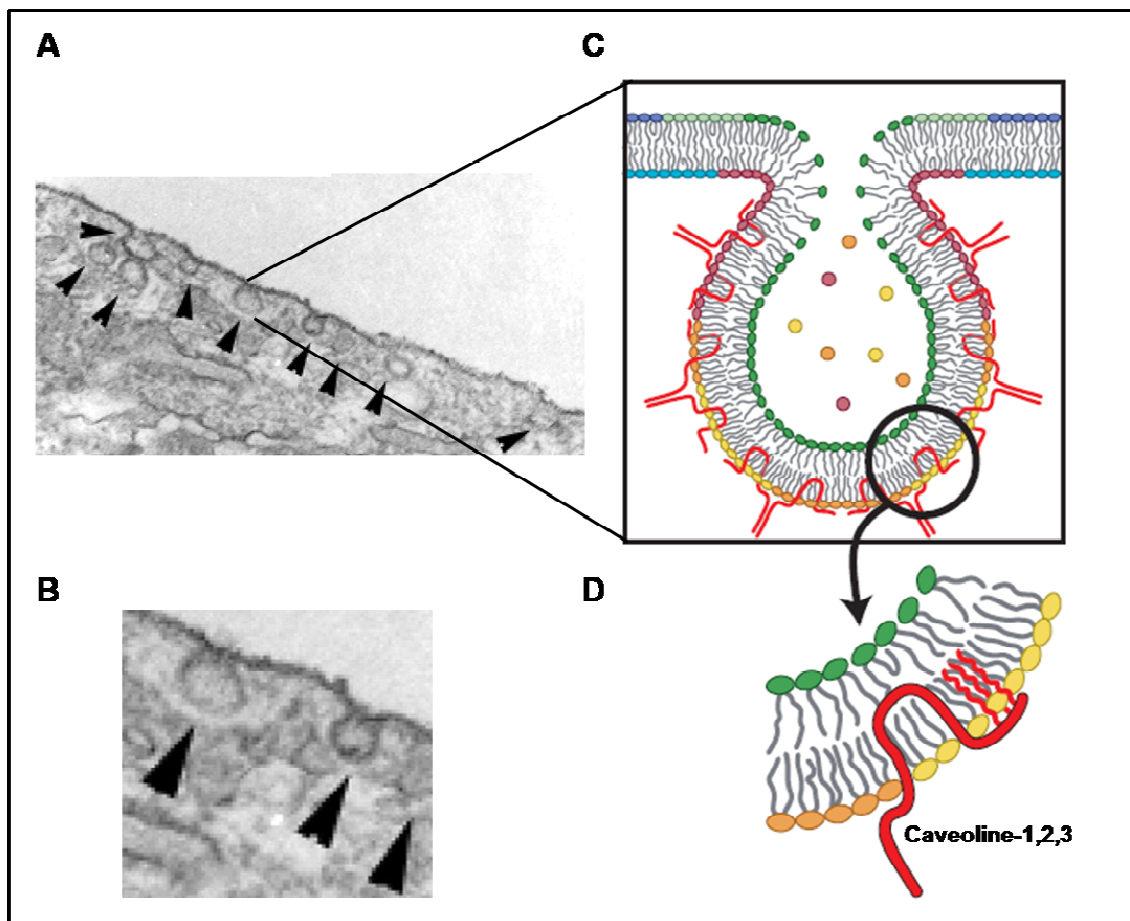


Abbildung 1-11: Caveolae und Caveoline.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der kleinen Ω-förmigen Caveolae in der Plasma-Membran einer Endothelzelle (*bovine aortic endothelial cells*, BAEC). (B) Schematische Übersicht des Aufbaus der Caveolae und der Caveolin-Proteine. Modifiziert nach (Parton et al. 2001, Rizzo et al. 2003).

Schlörmann und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass die Caveolae nach einer schnellen Hochdruck-Kryofixierung eine einfache Becher-Form ohne oberflächliche Verengung aufweisen (Schlörmann et al. 2010). Die einfache Omega-Form der Caveolae ist auf die Behandlung mit Glutaraldehyd während der Fixierung des Gewebes für die elektronenmikroskopische Untersuchungen zurückzuführen.

Caveolae liegen entweder einzeln oder in Ketten entlang der Zelloberfläche und werden in den meisten Zelltypen wie Adipozyten, Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten gefunden. Je nach Zelltyp sind verschiedene Formen der Caveolae vertreten. In Skelettmuskelzellen befinden sich Netzwerke von miteinander in Verbindung stehenden Caveolae. Caveolae-Rosetten sind in Adipozyten zu finden und freie tubuläre und vesikuläre Caveolae in Endothelzellen (Parton et al. 1997; Scherer et al. 1994; Simionescu et al. 1975). In humanen Fibroblasten wurden tiefe und flache Caveolae beschrieben (Fujimoto et al. 2000).

Die Oberflächendichte variiert je nach Polarität des Zelltypes und kann auf bestimmte Bereiche der Zelloberfläche begrenzt sein (apikal/basolateral) (Stan 2005). Mit etwa 10.000 – 30.000 Caveolae/Zelle machen Caveolae 15 % des totalen Zellvolumens in Endothelzellen aus (Mehta & Malik 2006). Mittlerweile wurden die Hauptstrukturproteine der Caveolae, die Caveoline (Cav), in die Definition der Caveolae mit aufgenommen.

Die Caveoline sind für die Bildung der caveolären Struktur essenziell (Razani et al. 2002; Simons & Toomre 2000). Seitdem zählen auch Caveolin-haltige Vesikel ohne Verbindung zur Plasmamembran zu caveolären Strukturen. Caveoline dienen bei der Unterscheidung der Zellmembrandomänen als Markerproteine und spielen auch bei der Entschlüsselung der molekularen Struktur der Caveolae und deren Funktion eine wichtige Rolle. So wird angenommen, dass die zelltypische Funktion der Caveolae im Zusammenhang mit deren Häufigkeit und Ausprägungen stehen. Die genauen Mechanismen, die zur Bildung der Caveolae führen, sind jedoch bis heute nicht ausreichend geklärt.

Caveolae sind auf biochemischer Ebene den *Lipid Rafts* sehr ähnlich. *Lipid Rafts* sind Domänen der Zellmembran, die sich aufgrund einer veränderten Lipid- und Proteinzusammensetzung von der restlichen Membranregion unterscheiden und teilweise für die Signaltransduktion der Zelle verantwortlich sind (Nichols 2003; Nabi & Le et al. 2003; Munro 2003). Caveolae bilden ebenso wie *Lipid Rafts* innerhalb der Zellmembran Mikrodomänen und sind reich an Cholesterol, Sphingolipiden und Proteinrezeptoren (Razani et al. 2002; Simons & Toomre 2000). Während *Lipid Rafts* jedoch wie kleine Flöße in der Lipiddoppelschicht treiben, stellen Caveolae die bereits genannten becherförmigen Oberflächeninvaginationen dar. Der Cholesterolgehalt spielt für die Bildung der caveolären Struktur eine kritische Rolle. So muss für die Bildung der Caveolae eine bestimmte Mindestmenge an Cholesterol vorliegen (Hailstones et al. 1998). Caveolae enthalten, abhängig vom Zelltyp, etwa 4-30 % des membranären Cholesterols und bis zu 95 % der zellulären Sphingolipide (Smart et al.

1999). Agenzien wie Nystatin oder Cyclodextrin können aufgrund ihrer Struktur der Plasmamembran das Cholesterol entziehen und somit die lipidhaltigen Mikrodomänen zerstören. In Zellen, die mit diesen Agenzien behandelt wurden, fehlen morphologisch identifizierbare Caveolae (Hailstones et al. 1998; Rothberg et al. 1992). Aus dem hohen Cholesterolgehalt ergibt sich zudem eine geringe Dichte und hohe Unlöslichkeit in schwachen nicht-ionischen Detergenzien wie Triton-X.

Die Caveolae sind an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt, wie etwa Endozytose, intrazelluläre Transporte und Cholesterol-Homöostase in der Zelle (Cohen et al. 2004). Einige pathogene Mikroorganismen umgehen den klassischen lysosomalen Transportweg, indem sie sich über die Caveolae Eintritt in die Zelle verschaffen (Norkin 2001) und direkt nach der Akkumulation zum endoplasmatischen Retikulum (ER) gelangen. Zudem sind Caveolae an der Aggregation vieler Proteine beteiligt, die eine wichtige Rolle in Signaltransduktionsprozessen spielen. So befinden sich in den Caveolae unter anderem Proteinkinasen, Rezeptoren, Kanäle und weitere wichtige Bestandteile einiger Signalkaskaden.

1.6.1 Caveoline und Caveolin-1

Die Familie der Caveoline umfasst die drei Mitglieder Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3. Die Caveolin-Gene weisen untereinander eine hohe Homologie auf und sind in verschiedenen Spezies sehr konserviert. Die verschiedenen Caveoline sind in unterschiedlichen Zelltypen verteilt und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktionen (Carver, Schnitzer 2003; Carver et al. 2003). Caveolin-3 ist spezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen zu finden, während Caveolin-1 und Caveolin-2 in den meisten Zelltypen koexprimiert werden (Liu et al. 2002; Fujimoto 2000).

Das Caveolin-1 Protein, ursprünglich *vesicular integral-membrane protein* (VIP21), ist ein 21-24 kDa großes, integrales Transmembranprotein und ist maßgeblich an der Ausbildung der Caveolae-Struktur beteiligt (Podar et al. 2003). Es besitzt einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus und eine intramembranäre Domäne mit einer schleifenartigen Struktur, dem sogenannten *hairpin loop* (Abbildung 1-12) (Razani et al. 2002). Zudem besitzt es eine 32 Aminosäure lange und hydrophobe Domäne (AS 102-34), die für die transmembranäre Lokalisation verantwortlich ist (Monier et al. 1995). Weiterhin sind die NH₂-Terminus-Membranbindungsdomäne (N-MAD, AS 82-101), auch *Caveolin scaffolding domain* (CSD) genannt, und die COOH-Terminus-Membranbindungsdomäne (C-AMD, AS 135-150) für die Membranbindung essenziell (Schegel & Lisanti 2000).

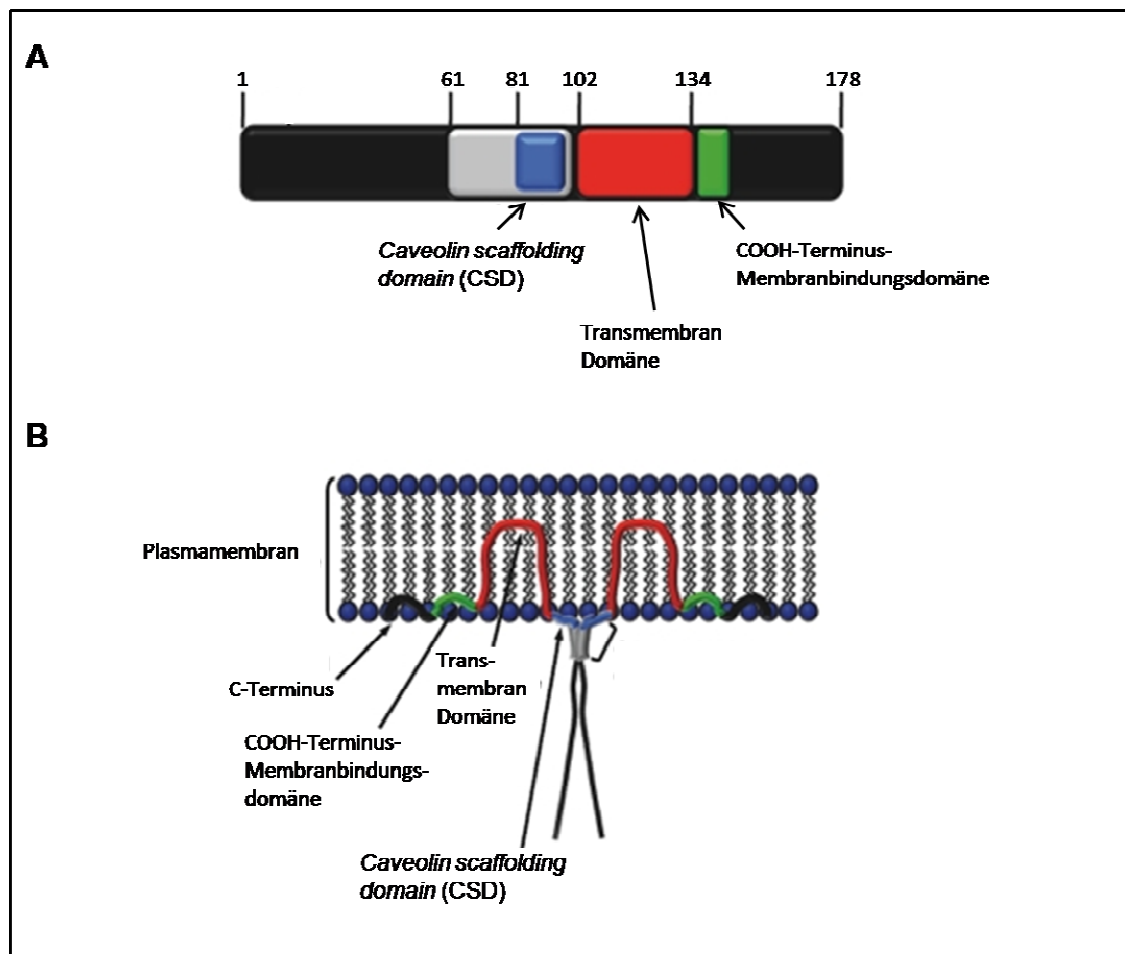


Abbildung 1-12: Primäre Struktur des Caveolin-1.

(A) Schematische Darstellung der wichtigsten funktionellen Domänen von Caveolin-1. Die Aminosäurepositionen sind über dem Schema dargestellt. (B) Lokalisation von Caveolin-1 in der Plasmamembran. Zwei Caveolin-1-Monomere bilden vereinfacht dargestellt ein Dimer, *in vivo* assoziieren 14-16 Monomere, um ein einzelnes Caveolin-1-Homo-Oligomer zu bilden. Sowohl die Amino- als auch Carboxy-terminalen Domänen ragen ins Zytosol der Zelle, während ein *hairpin loop* sich durch die doppelschichtige Plasmamembran zieht. Modifiziert nach (Hehlhans & Cordes 2011).

Caveolin-1 liegt in zwei Isoformen, Caveolin-1 α und Caveolin-1 β vor, wobei die Caveolin-1 β -Isoform um 32 Aminosäuren kürzer ist, da sie aus einer alternativen Translation-Startsequenz resultiert (Kogo & Fujimoto 2000; Scherer et al. 1995). Während Caveolin-1 α überwiegend in den tieferen Caveolae lokalisiert und effizienter bei der Bildung der Caveolae ist, bildet Caveolin-1 β hingegen überwiegend flache Caveolae aus (Fujimoto et al. 2000). Beide Isoformen besitzen die typische *Caveolin scaffolding domain* (CSD) und den acetylierten C-Terminus, während die N-terminalen Aminosäuren nur in Caveolin-1 α zu finden sind.

Caveolin-1 dient nicht nur als Strukturprotein der Caveolae, sondern spielt eine große Rolle bei der Endo-, Exo- und Transzytose sowie der Lipidhomöostase und in der Tumorprogression und Tumorgenese im Sinne der Regulation des Zellüberlebens und des Metastasierungspotentials (Juhasz et al. 2003; Ho et al. 2002).

Zudem vernetzt Caveolin-1 auf der zytoplasmatischen Seite über die *Caveolin scaffolding domain* (CSD) Zytoskelettassoziierte Proteine, Zelladhäsionsmoleküle und verschiedene Signalmoleküle miteinander und wirkt regulatorisch auf die damit verbundenen Signalprozesse ein. Die *Caveolin scaffolding domain* ist eine 20 Aminosäure umfassende, am N-Terminus lokalisierte Sequenz des Caveolin-1, an die Proteine mit dem sogenannten Caveolin-1-bindenden Motiv binden können (Razani et al. 2002; Machleidt et al. 2000; Luetterforst et al. 1999). Caveolin-1 bildet mit Caveolin-2 stabile Homo- und Hetero-Oligomere, die aus 14-16 Monomeren bestehen und nur durch Behandlung mit starken Detergenzien dissoziieren (Li et al. 1996; Sargiacomo et al. 1995; Monier et al. 1995). Auch Cholesterol, das wie bereits erwähnt neben Caveolin maßgeblich an der caveolären Struktur beteiligt ist, bindet an Caveolin-1 (Fra et al. 1995). Die hohe Konzentration von Cholesterol und die Insertion von Caveolin-1 in der Plasmamembran führen dann zur Vergrößerung der Oberfläche der zytoplasmatischen Hälfte der Doppelschicht im Verhältnis zur exoplasmatischen Membranhälfte und es kommt zur Einstülpung der Membran. Weiterhin interagiert Caveolin-1 direkt mit zahlreichen Signalmolekülen, darunter H-Ras, Src Tyrosin-Kinase der Src-Familie, extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1/2), Mitogen-aktivierten ERK-Kinasen (MEK1/2), α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen sowie der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Razani et al. 2002). Auch hier ist die *Caveolin scaffolding domain* für die Interaktion von Caveolin-1 mit den verschiedenen Proteinen zuständig.

Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) war eines der ersten Nicht-Rezeptor-Proteine, das in den Caveolae der Plasmamembran gefunden wurde (Feron et al. 1996). Seither haben verschiedene *in vitro* Studien die Wechselwirkung zwischen Caveolin-1 und eNOS beschrieben und konnten eine Interaktion von eNOS mit der *Caveolin scaffolding domain* (CSD, AS 81-101) des Caveolin-1 belegen (Schilling et al. 2006; Garcia-Cardena et al. 1997; Ju et al. 1997). Diese Interaktion führt zu einer signifikanten Reduzierung der katalytischen Aktivität der eNOS. Diese Enzyminhibierung kann durch eine positive allosterische Regulation durch Kalzium-Calmodulin aufgehoben werden (Ju et al. 1997; Michel et al. 1997). Ein erhöhter Kalziumspiegel führt zur Separierung von Caveolin-1 und eNOS, was in einer Aktivierung des frei werdenden Enzyms resultiert. Später kommt es zu einer Rückbildung des Caveolin-eNOS-Heteromers, eine Wiederanlagerung an die Caveolae findet statt und das Enzym ist erneut inhibiert (Feron et al. 1998).

1.6.2 Caveolin-1-defiziente Mäuse

Anhand von Caveolin-1-*Knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 für die Bildung der Caveolae essentiell ist. In den Endothelzellen und Adipozyten dieser Caveolin-1-defizienten Mäusen konnten keine caveolären Strukturen nachgewiesen werden. Auch die Proteinmenge von Caveolin-2 ist um etwa 90–95 % reduziert, obwohl das Expressionslevel der Caveolin-2 mRNA im Vergleich zu den Wildtyptieren unverändert ist. Zudem können frisch isolierte Aorten der Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse keinen gleichmäßigen kontraktile Tonus entwickeln und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und cGMP war deutlich erhöht (Drab et al. 2001). Es kam also zu einer Deregulation des NO-Signalweges. Somit konnte gezeigt werden, dass die caveoläre Lokalisation für die maximale eNOS-Aktivität essentiell ist und diese Enzymaktivität von Caveolin-1 negativ reguliert wird (Qian et al. 2013; Bucci et al 2000; Garcia-Cardena et al. 1997).

1.7 Fragestellung

Das Endothel ist einer der wichtigsten Regulatoren des Gefäßtonus, also der Vasokonstriktion und Vasodilatation, als Reaktion auf definierte Reize. Es nimmt mit Hilfe von Prostazyklin (PGI_2), Stickstoffmonoxid (NO) und dem *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF), Einfluss auf den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur. Während die Vasodilatoren NO und PGI_2 vollständig charakterisiert sind, ist die Beschaffenheit des endothelabhängigen Hyperpolarisationsfaktor (EDHF) noch nicht vollständig geklärt. Die verschiedenen Erklärungsansätze zur Klärung der Identität und des Mechanismus der EDHF-vermittelten Vasodilatation legen nahe, dass es sich hierbei nicht nur um ein einzelnes Molekül oder einen einzelnen Signalweg handelt. Es scheint sich hier um ein komplexes System aus verschiedenen Signalwegen zu handeln, denen eine endotheliale Hyperpolarisation vorausgeht und in denen der mechanosensitive Calciumkanal TRPV4 und die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ eine wichtige Rolle spielen.

Die Membranen der Endothelzellen enthalten 50-100 nm große Einstülpungen, die sogenannten Caveolae. Den Caveolae werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Sie dienen der Trans- und Endozytose, der Regulation des Cholesterolumsäostase in der Zelle und der Aggregation vieler Proteine, die eine wichtige Rolle in Signalprozessen spielen. Die Identifizierung von Caveolin-1 als Strukturprotein der Caveolae erlaubte eine Aufreinigung der caveolären Membranfraktionen und ermöglichte somit die genaue Untersuchung caveolärer Proteine. Es ist bekannt, dass sich in den Caveolae unter anderem Rezeptoren, Proteinkinasen und weitere Bestandteile von Signalkaskaden befinden. Daher werden Caveolae als Mikrodomänen angesehen, welche die an der Signalkaskade beteiligten Moleküle in enger räumlicher Nähe beherbergen und so eine effektive Signaltransduktion ermöglichen.

Unsere Hypothese ist, dass die TRPV4 und K_{Ca} -Kanäle, die funktionell zusammen hängen auch räumlich assoziiert sind. Also die Caveolae als Mikrokompartment fungiert und die funktionellen Einheiten in einer räumlichen Struktur angeordnet sind. Eine Störung dieser Caveolaefunktion und des mechanosensitiven Funktionskomplexes führt zur endothelialen Dysfunktion und pathologischen Gefäßregulation.

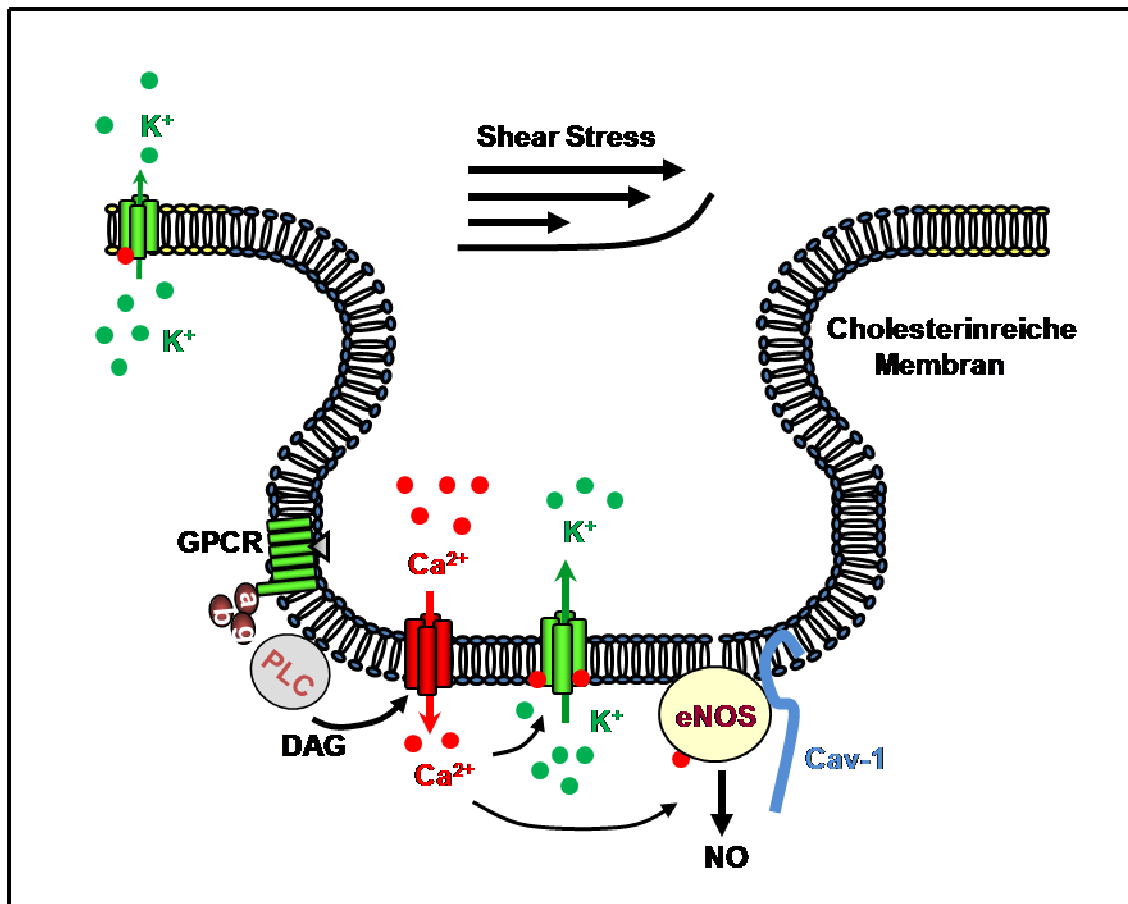


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der Caveolae als Mikrokompartment.

(GPCR) G-Protein-gekoppelter Rezeptor, (PLC) Phospholipase C, (eNOS) endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, (DAG) 1,2-Diacylglycerine, (NO) Stickstoffmonoxid.

Im Rahmen der Dissertation stehen folgende Ziele im Mittelpunkt:

Charakterisierung der Caveolae als Mikrokompartment.

- 1) Untersuchung, ob der mechanosensitiv-assoziierten Ionenkanal TRPV4 und die K_{Ca} -Kanäle in Caveolae lokalisiert und Teil eines Mechanotransduktion-Komplexes sind.
- 2) Charakterisierung der Rolle des caveolären Kompartiments in der Mechanotransduktion durch mechanische oder hämodynamische Reize.
- 3) *in vivo* Untersuchungen, welchen Einfluss das Fehlen der Caveolae, also der Mikrokompartmentierung, auf die K_{Ca} -Ströme hat.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Observer Z.1 Mikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Nanodrop 2000c	PeqLab; Erlangen, Deutschland
SR GSD (DMI 6000B TIRF)	Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland
Stereomikroskop	Zeiss; Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss; Jena, Deutschland
CO₂-Inkubator	Heraeus; Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Mikrofuge (Heraeus Pico 17 Centrifuge)	Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Gerät	Thermo Scientific; Wedel, Deutschland
FUSION-FX7 Advance-Superbright (4.2/10 Mio Pixel CCD-camera)	PeqLab; Erlangen, Deutschland
Schwingungsisolierter Tisch	Physik Instrumente Waldborn; Deutschland
Patch-Clamp Mikromanipulator	Eigenbau Max-Planck-Institut;

	Frankfurt/, Deutschland
Computergesteuerter EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker	HEKA Elektronik; Lambrecht, Deutschland
Main Pipettenziehgerät DMZ-Universal-Puller	Zeitz; Augsburg, Deutschland
Borosilikatkapillaren, Länge: 7,5 cm, Innendurchmesser: 0,9 mm, Wandstärke: 0,3 mm	Clark Electromedical Instruments; Pangbourne, Großbritannien
Experimentierbad: Badkammer für 2 ml Volumen	Wolfgang Hampel; Neu-Isenburg, Deutschland
Meß- und Referenzelektrode: Chlorierte Silberdrähte	Silber-/Silberchlorid-Elektrode
Thermocycler Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresebad Agagel Mini Biometra	Blomed-Analytik; Deutschland
UV-Transilluminator Gene Genius	Syngene; Cambridge, Großbritannien
Laborwaage BP310P	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Ibidi Pump-System	Ibidi; München, Deutschland
Platten-Kegel-Viscometer	Martin-Luther-Universität; Halle, Deutschland

2.2 Chemikalien

TRAM-34 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Heike Wulff (University of California at Davis, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-2: Verwendete Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Acetylcholin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Fermentas St. Leon- Rot, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Dextran	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA
DNA Ladder 50bp	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
DMEM (High Glucose)	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Mix	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Dynabeads Protein G	Novex by Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck; Darmstadt Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
Gelatine, from porcine skin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyde-Solution 2 %	Appli Chem; Darmstadt, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad ; München, Deutschland

KCl	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
MgCl₂	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
L-NNA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
MES	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Na₂CO₃	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Nitrocellulose Mambran	Bio-Rad ; München, Deutschland
Nuclease- Free Water	peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific; Waltham, MA USA
Pro Long Antifade Reagents	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
PBS mit/ohne Ca²⁺/Mg²⁺	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Primer Human, Maus	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Complete	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Quick Start Bradford Protein Assay	Bio-Rad ; München, Deutschland
Resolving Gel Buffer	Bio-Rad ; München, Deutschland
Roti-Load 1	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Skin Milk Powder	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sodiumazide	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sodium-Orthovandate	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Stocking Gel Buffer	Bio-Rad ; München, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific; Waltham, MA USA
TEMED	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tris/HCL	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Triton-X	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

Tween 20	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, Deutschland
UCL 1684	Tocris; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

2.3 Antikörper und Sekundärreagenzien

Tabelle 2-3: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies/ Eigenschaft	Hersteller	Verdünnung (WB/IF)	IP
Anti-Caveolin-1	Maus pk	BD Biosciences; San Jose CA, USA	1:500/1:200	10 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Anti-Caveolin-1	Kaninchen pk	BD Biosciences; San Jose CA, USA	1:500	-
Anti-K_{Ca}3.1	Kaninchen pk	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:200/1:100	10 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Anti-K_{Ca}3.1	Kaninchen pk	Pineda Antibody Services	1:200/1:100	-
Anti-K_{Ca}2.3	Kaninchen pk	Alomone Labs; Jerusalem, Israel	1:500/1:200	10 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Anti-TRPV4	Kaninchen pk	Alomone Labs; Jerusalem, Israel	1:500/1:200	10 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Anti-TRPV4	Schaf pk	Pierce/Thermo Scientific ; Rockford, USA	1:500/1:200	10 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Anti- eNOS/NOS	Kaninchen pk	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:500/1:200	
Anti-β-Adaptin	Kaninchen pk	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:500/1:200	

Anti-GAPDH	Huhn pk	Bethyl Laboratories; Montgomery, USA	1:1000
Normal Kaninchen IgG	Normal Kaninchen IgG	Merck/Millipore; Darmstadt, Deutschland	5 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Normal Kaninchen IgG	Normal Kaninchen IgG	Merck/Millipore; Darmstadt, Deutschland	5 µl <i>Dynabeads</i> Protein G
Normal Schaf IgG	Normal Schaf IgG	Merck/Millipore; Darmstadt, Deutschland	5 µl <i>Dynabeads</i> Protein G

Tabelle 2-4: Sekundäre Antikörper und Sekundärreagenzien

Bezeichnung	Spezies/ Eigenschaft	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Anti- Maus IgG	Ziege H+L	HRP- konjugiert	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:10.000
Anti- Kaninchen IgG	Ziege H+L	HRP- konjugiert	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:10.000
Anti- Schaf IgG	Esel H+L	HRP- konjugiert	Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz CA, USA	1:10.000
Anti- Maus IgG	Ziege H+L	Alexa Fluor 555	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA	1:250
Anti- Maus IgG	Ziege H+L	Alexa Fluor 488	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA	1:250
Anti- Kaninchen IgG	Ziege H+L	Alexa Fluor 488	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA	1:250
Anti- Kaninchen IgG	Ziege H+L	Alexa Fluor 647	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA	1:250
Anti- Schaf IgG	Esel H+L	Alexa Fluor 647	Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA	1:250

2.4 Standards

Die in dieser Arbeit verwendeten Standards stammen von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

Standard für Agarose-Gelelektrophorese:

<i>Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder</i>	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp
-----------------------------------	---

Standard für SDS-Gelelektrophorese:

<i>Prestained Protein Ladder</i>	10, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130, 170 kDa
----------------------------------	---

Standard für Proteinbestimmung:

<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml
-----------------------------------	--

2.5 Standartisierte-Systeme

Tabelle 2-5: Verwendete Kit-Systeme

Name	Hersteller
High Pure RNA Isolation Kit	Roche GmbH ; Mannheim, Deutschland
iScript	Bio-Rad ; München, Deutschland
Quick Start Bradford Kit 2	Bio-Rad ; München, Deutschland

2.6 Nährmedien

Für die Kultivierung der HMEC-1 wurde *Dubelccos Modified Eagles Medium* (DMEM) verwendet. Dem Grundmedium DMEM High Glucose (PAA) wurden 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PAA) und 10 % FBS (PAA) zugesetzt.

2.7 Tiere

Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse (Stamm: Cav1tm1Mls/J) und korrespondierende Wildtyp-Mäuse (Stamm: B6129SF2/J) wurden bei „The Jackson Laboratory“, Bar Harbor, Maine, USA bestellt.

2.8 Zelllinien

2.8.1 HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells):

HMEC-1-Zellen sind immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, die von Ades et al. mit dem Plasmid PBR-322 inklusive dem Genprodukt *Simian Virus 40 A* stabil transfiziert wurden (Ades et al. 1992). In Kultur wachsen sie adhärent und bilden nach Erreichen von Konfluenz eine Monolayer-Kultur mit „Kopfsteinpflaster“-Muster. Sie zeigen eine Expression endothelzelltypischer Oberflächenmoleküle (Von-Willebrand-Faktor, CD31, CD36, ICAM-1, CD44). Hohe Übereinstimmungen der Endothelzellmarker zwischen den permanent immortalisierten und den primären Endothelzellen weisen darauf hin, dass die generierte Zelllinie HMEC-1 ein gutes Modell für primäre mikrovaskuläre Hautendothelzellen darstellt.

2.8.2 CAEC (*Carotid Artery Endothelial Cells*):

Für *in vivo* Experimente wurden primäre Endothelzellen eines arteriellen Zellmodells benötigt. Bei den CAEC-Zellen handelt es sich um primäre, murine Endothelzellen, die aus der *Arteria carotis communis* der Maus isoliert wurden.

Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien mit entsprechendem Medium

Name	Medium	Inkubation	Eigenschaften
HMEC-1	DMEM + 10 % FCS + 2 % P/S	37 °C, 10 % CO ₂	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie
CAEC	DMEM + 10 % FCS + 2 % P/S	37 °C, 10 % CO ₂	Primäre Endothelzellen aus der <i>Arteria carotis communis</i> der Maus

2.9 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 2-7: Verwendete Puffer und Lösungen

Blockpuffer:	5 % Milchpulver (fettfrei) in 1x TBS/T
1 x Blotpuffer:	19,2 mM Glycin 2,5 mM Tris Base 20 % Methanol
1 x Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA 5 mM EGTA 1 % IGEPAL 1 mM Sodium-Orthovandate 10 µl/ml Protease-Inhibitor
Ethidiumbromid-Färbelösung:	1 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE
1 x PAGE-Elektrodenpuffer:	19,2 mM Glycin 2,5 mM Tris Base 0,1 % SDS
MBS-Puffer:	25 mM MES, pH6,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA
Stripping-Puffer:	0,25 mM Glycin 1 % SDS pH 2,0 mit HCl eingestellt
1 x TAE-Puffer:	40,8 mM Tris 0.02 mM 0,5 M EDTA, pH 8,0 20,4 mM Eisessig
1 x TBS:	2 mM Tris-HCL 13,7 mM Natriumchlorid pH 7,6 eingestellt mit HCl
1 x TBS/T:	1 x TBS/T 0,1 % Tween 20

Trypanblaulösung:0,8 % (v/v) Trypanblau

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Mikroskopie, Genexpressions- und Proteinanalysen wurden humane dermale mikrovaskuläre Zellen einer immortalisierten Zelllinie (HMEC-1) verwendet (Ades et al. 1992). Nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff müssen die Zellen nach einem bestimmten Schema aufgetaut werden, um ein optimales Anwachsen der Kultur zu gewährleisten. Ein Kryoröhrchen mit je 1 ml der entsprechenden Zellen wurde dem Stickstoffbehälter entnommen und mit leicht geöffnetem Deckel bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 9 ml des entsprechenden Mediums bei 1250 rpm für 10 min gewaschen, in 20 ml Medium aufgenommen und in einer 75 cm² Flasche ausgesät.

Diese wurden montags mit 1×10^6 und freitags mit 2×10^6 Zellen pro Flasche (75 cm²) in 20 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS (v/v) und 2 % P/S ausgesät und bei 37°C / 10 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zum Passagieren der konfluent gewachsenen HMEC-1 wurde der Zellrasen vorsichtig mit CA²⁺/Mg²⁺-freiem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurden 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS (v/v) und 2 % P/S hinzu gegeben, gut resuspendiert und die Zellzahl (Abschnitt 3.1.2) bestimmt.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels Trypanblaulösung in der Neubauer-Zählkammer. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,8 %-igen (v/v) Trypanblaulösung versetzt, resuspendiert und anschließend in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Trypanblau wurde für die Vitalfärbung von Zellen verwendet, abgestorbene Zellen wurden dunkelblau angefärbt. Die lebenden Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.1.3 Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin

Methyl- β -Cyclodextrin wird in der Zellbiologie verwendet, um Cholesterol aus der Zellmembran zu lösen und so die cholesterinhaltigen *Lipid Rafts*, hier die Caveolae, innerhalb der Plasmamembran zu zerstören. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die aus mehreren Glukoseeinheiten (D-(+)-Glukopyranosen) bestehen, die α -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Außenseite des Moleküls ist hydrophil und besitzt einen hydrophoben Kern. Diese „*hydrophobic/internal cavity*“ befähigt die Cyclodextrine, hydrophobe Verbindungen einzuschließen und in wässriger Umgebung löslich zu machen.

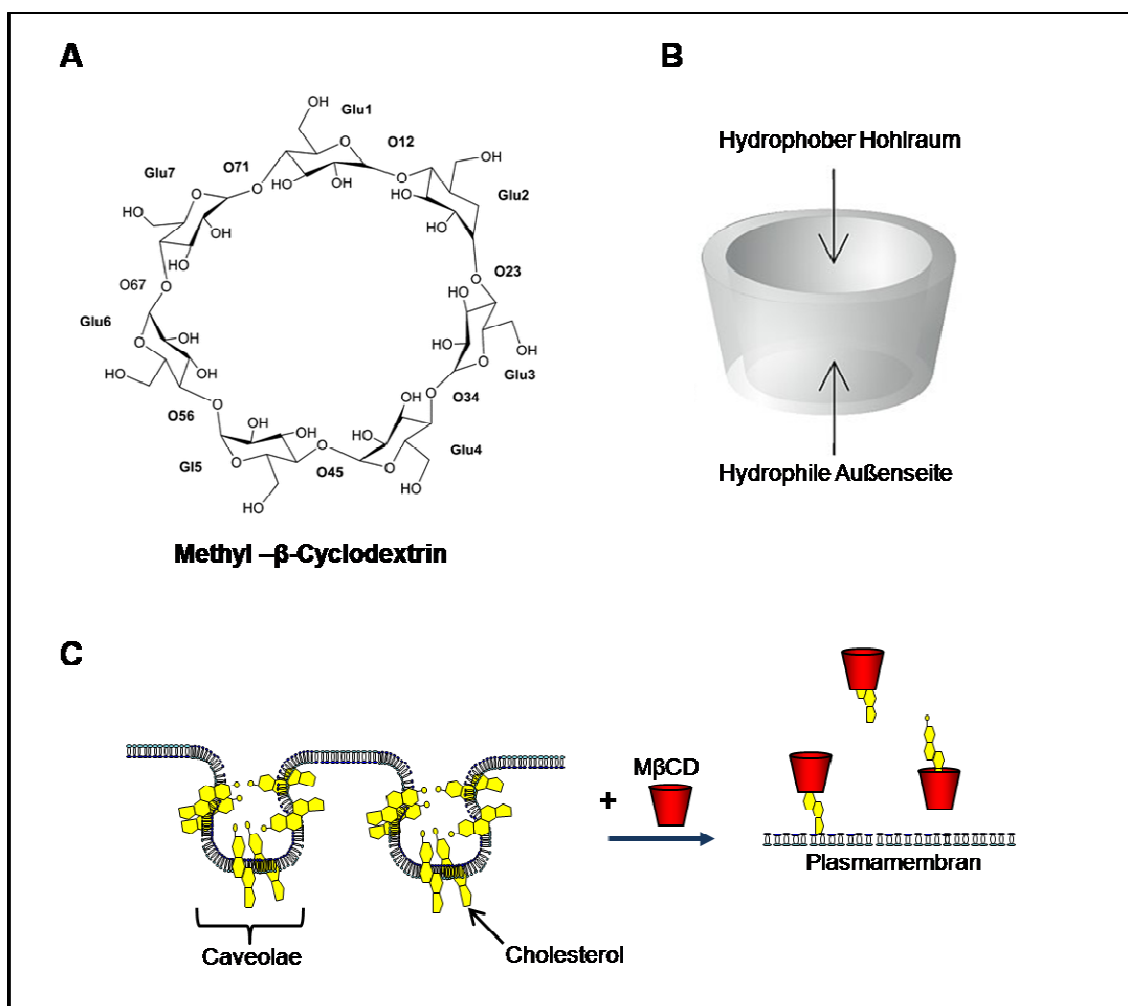


Abbildung 3-1: Strukturformel und Wirkungsmechanismus von Methyl- β -Cyclodextrin.

(A) Strukturformel von Methyl- β -Cyclodextrin. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die aus mehreren Glukoseeinheiten (D-(+)-Glukopyranosen) bestehen, die α -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. (B) Schematischer Aufbau von Methyl- β -Cyclodextrin. Die Außenseite des Moleküls ist hydrophil und besitzt einen hydrophoben Kern. (C) Schematischer Wirkungsmechanismus von Methyl- β -Cyclodextrin. Methyl- β -Cyclodextrin löst Cholesterol aus der Zellmembran, wodurch die cholesterinhaltigen *Lipid Rafts*, hier die Caveolae, innerhalb der Plasmamembran zerstört werden.

Werden Zellen einer hohen Konzentrationen (5-10 mM) an Cyclodextrinen für einen längeren Zeitraum ausgesetzt, können 80-90 % des ursprünglich vorhandenen Cholesterols entfernt werden. Unter diesen Bedingungen verliert die Zelle ihre ursprüngliche Morphologie, rundet sich ab und verliert ihre Lebensfähigkeit.

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden für 40 min. mit 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin im Inkubator behandelt. Anschließend wurden die Zellen 3x mal mit PBS gewaschen und für die Proteinisolation vorbereitet.

3.2 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen

3.2.1 Kegel-Platten-Viskometer

Für die Proteingewinnung erfolgte die Applikation der laminaren Schubspannung auf konfluent gewachsene Endothelzellen mit Hilfe eines nach Sdougos und Mitarbeitern modifizierten Kegel-Platten-Viskometer (Morawietz et al. 2000; Schubert et al. 2000; Sdougos et al. 1982).

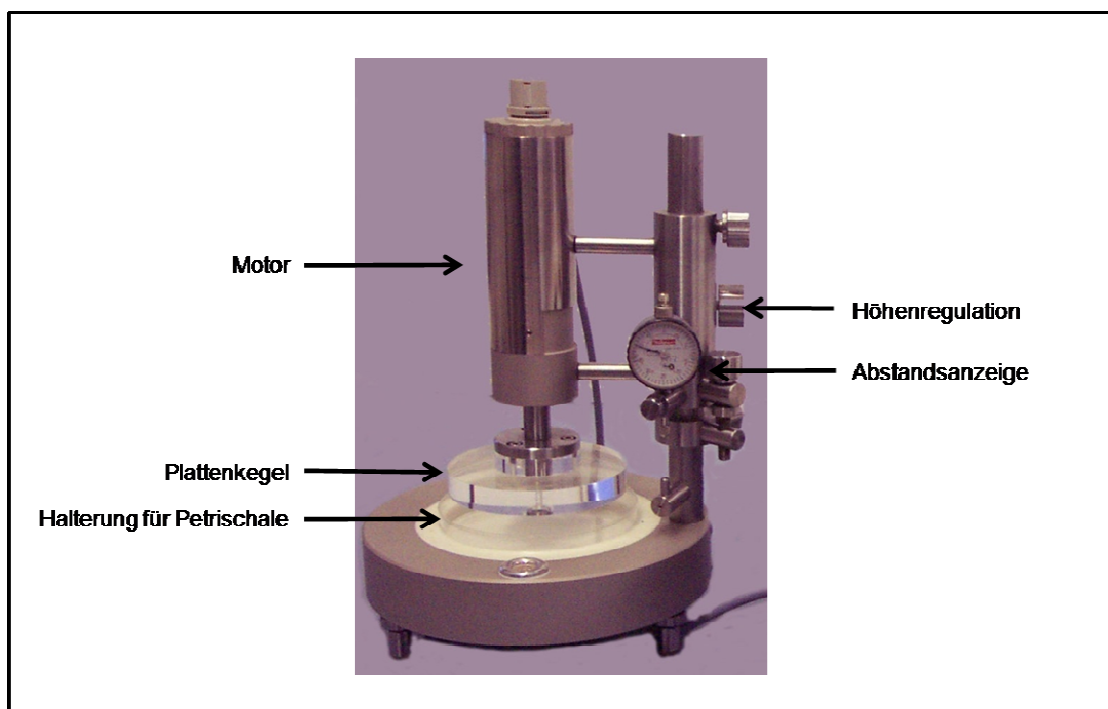


Abbildung 3-2: Kegel-Platten-Viskometer.

Nach Sdougos und Mitarbeitern modifizierten Kegel-Platten-Viskometer (Morawietz et al. 2000; Schubert et al. 2000; Sdougos et al. 1982). Das Kegel-Platten-Viskometer wurde im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle angefertigt.

Das Kegel-Platten-Viskosimeter wurde im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle angefertigt und ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

Das Kegel-Platten-System besteht aus einer Halterung für 96 mm Petrischalen, einem drehbaren Plattenkegel aus Polycarbonat mit Höhenjustierung, einer Motor-Getriebe-Kombination und einer Steuereinrichtung zur stufenlosen Einstellung der Kegelgeschwindigkeit. Um eine laminare Strömung des Mediums über den Endothelzellen zu ermöglichen, beträgt der Winkel α des Plattenkegels $0,5^\circ$. Die Intensität der Schubspannung ist sowohl von der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel α des Kegels als auch von der Viskosität des Mediums abhängig (Abbildung 3-3). Durch die Variation der Drehzahl des Kegels und Änderungen der Viskosität des Mediums können die Strömungsverhältnisse in unterschiedlichen Blutgefäßen simuliert werden.

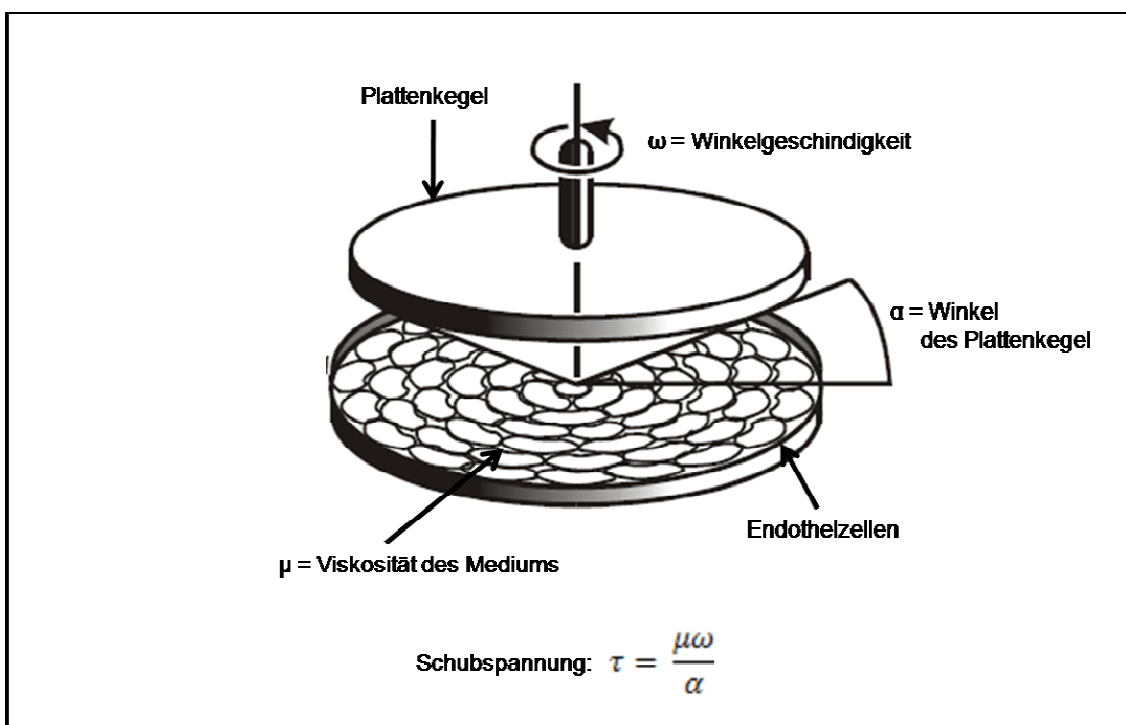


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Kegel-Platten-Viskosimeters.

Die Applikation der laminaren Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen erfolgt durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$. Die Schubspannung ist zudem von der Viskosität des Mediums und der Winkelgeschwindigkeit abhängig. Modifiziert nach (Schubert & Morawietz et al. 2004).

3.2.1.1 Quervernetzte Gelatine

Für die Applikation der Schubspannung mittels Kegel-Platten-Viskometer wurden HMEC-1 auf quervernetzter Gelatine kultiviert. Dazu wurden die 96 mm Petrischalen mit 0,5 % Gelatine (in PBS) beschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Gelatine abgenommen und die Petrischalen mit 2 % Glutaraldehyd 15 min bei 37°C inkubiert. Das Glutaraldehyd wurde entfernt und die Petrischale anschließend mit 70 % Ethanol für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten fünfmal für je 10 min mit PBS gewaschen. Die Platten können bis zur Verwendung mit PBS überschichtet bei 4°C gelagert werden.

3.2.1.2 Ansetzen der Schubspannung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von laminarer Schubspannung mit 15 dyn/cm² untersucht, die charakteristisch für arterielle Gefäße ist. Um einen Verlust des Mediums durch zu hohe Fliehkräfte bei hohen Winkelgeschwindigkeiten zu vermeiden, wird eine Erhöhung der Viskosität des Endothelzellmediums durch die Zugabe von Dextran erlangt. Die Zugabe von 5 % Dextran zum Endothelzellmedium erhöht die Viskosität um das 2,95-fache von 0,007 dyn/cm² auf 0,02065 dyn/cm². Endothelzellen wurden auf Quervernetzter-Gelatine-beschichteten 96 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden HMEC-1 mit frischem DMEM-Medium mit 5 % Dextran für 1 h stationär kultiviert, anschließend in das Kegel-Platte-System eingesetzt, der Kegel über den Endothelzellen abgesenkt und die gewünschte Schubspannung am Potentiometer der Steuerung durch Einstellung der entsprechenden Winkelgeschwindigkeit ausgewählt. Bei jedem Ansatz wurde eine interne, stationäre Kontrolle (ohne laminare Schubspannung) mit DMEM + 5 % Dextran analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von laminarer Schubspannung mit 15 dyn/cm² untersucht, die charakteristisch für arterielle Gefäße ist. Um einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte bei hohen Winkelgeschwindigkeiten zu vermeiden, wird eine Erhöhung der Viskosität des Endothelzellmediums durch die Zugabe von Dextran erlangt. Die Zugabe von 5 % Dextran zum Endothelzellmedium erhöht die Viskosität um das 2,95-fache von 0,007 dyn/cm² auf 0,02065 dyn/cm². Endothelzellen wurden auf Quervernetzter-Gelatine-beschichteten 96 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden HMEC-1 mit frischem DMEM-Medium mit 5 % Dextran für 1 h stationär kultiviert, anschließend in das Kegel-Platte-System eingesetzt, der Kegel über den Endothelzellen abgesenkt und die spezifische Schubspannung am Potentiometer der

Steuerung durch Einstellung der entsprechenden Winkelgeschwindigkeit ausgewählt. Bei jeder Probe wurde eine interne, stationäre Kontrolle (ohne laminare Schubspannung) mit DMEM + 5 % Dextran analysiert.

3.2.2 Flusskammern-Pumpsystem

Die Flusskammern bieten den Vorteil, dass die Zellen darin sowohl kultiviert, als auch stimuliert, gefärbt und optisch hochauflösend mikroskopiert werden konnten. In dieser Arbeit wurden ibiTreat μ -Slides I^{0.6} Luer (Abbildung 3-4) in Verbindung mit dem Flusskammern-Pumpsystem verwendet. Die Kanäle haben eine Wachstumsfläche von $2,5 \text{ cm}^2$, eine Höhe von $0,6 \text{ mm}$ und ein Volumen von $150 \text{ }\mu\text{l}$. Die Reservoirs fassen zusätzlich etwa $50\text{-}60 \text{ }\mu\text{l}$. Die Unterseite des Objektträgers besteht aus einem Deckglas der Stärke 1,5 ($180 \text{ }\mu\text{m}$) und kann direkt mikroskopiert werden.

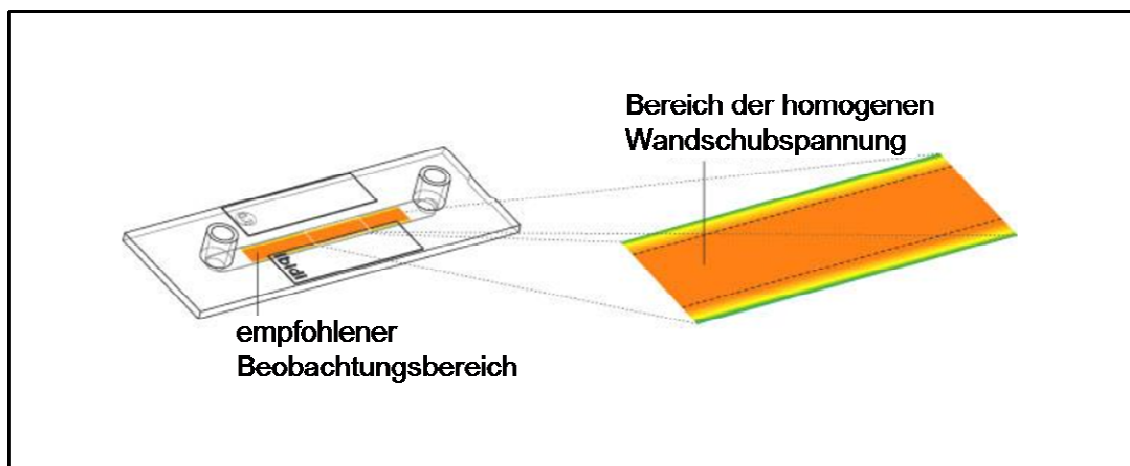


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung eines μ -Slide I 0.6 Luer.

Die Homogenität der laminaren Schubspannung über den gesamten Kanal ist anhand der Farben (orang) erkennbar. Lediglich am Kanalrand entstehen leicht inhomogene Bereiche. Modifiziert nach (Zantl, 2012).

Das Flusskammern-Pumpsystem besteht aus einer Luftdruckpumpe und ventilgeschalteten Reagenzienreservoirs. Eine definierte Flussrate und damit eine definierte Schubspannung im Inneren des Flusskanals, kann durch gezielte Wahl des Luftdruckes erzeugt werden.

Die vereinfachte Formel für das μ -Slide I^{0.6} Luer zur Berechnung der Schubspannung aus der Flussrate lautet (Zantl, 2012):

$$\tau = \eta * 60,1 * \phi$$

τ Schubspannung dyn/cm²

η Dynamische Viskosität dyn*s/cm²

ϕ Flussrate ml/min

Die verwendeten Medien wurden mit Penicillin/Streptomycin versehen, um Kontaminationen mit Bakterien vorzubeugen. Um Luftblasen zu vermeiden, wurden die μ -Slides, Schläuche und Medien vorab 24 Stunden zum Ausgasen in den Brutschrank gegeben.

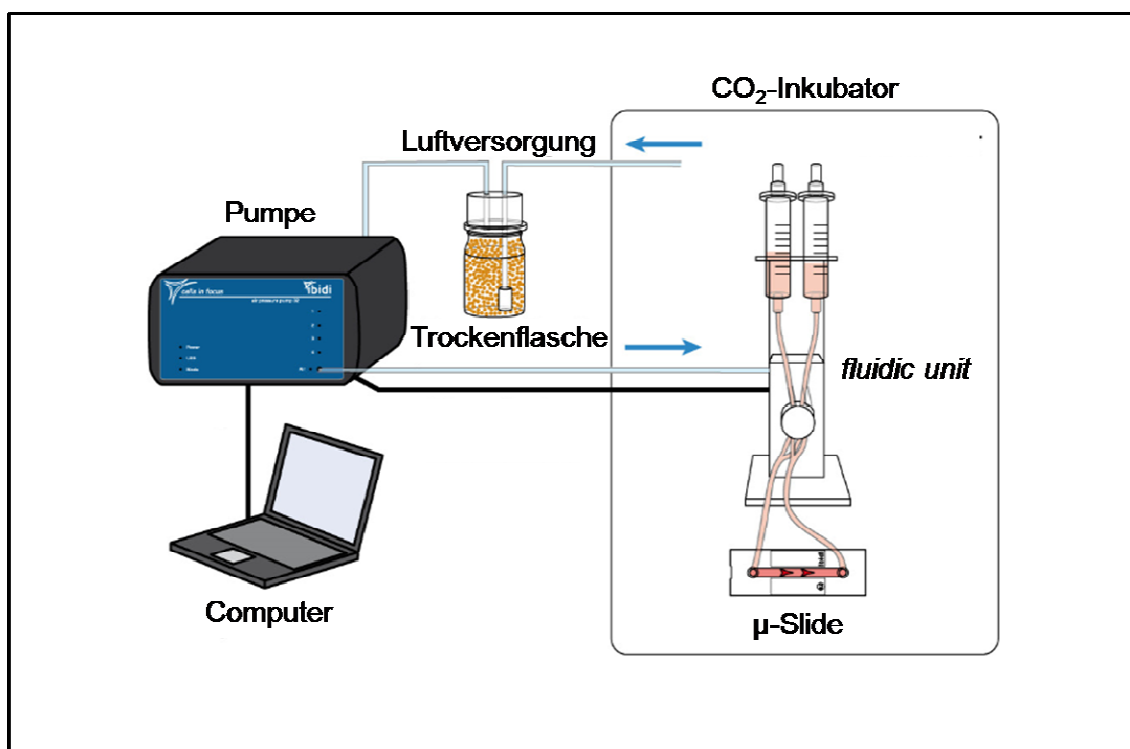


Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau des Flusskammern-Pumpsystems unter positivem Pumpendruck.

Um Korrosionen im Pumpengehäuse zu vermeiden, wird die angesaugte Inkubatorluft durch eine Trockenflasche geleitet. Modifiziert nach (Kroutvar & von Guttenberg, 2012).

Vor der Aussaat der Zellen wurde das Flusskammern-Pumpsystem aufgebaut. Die *Fluidic Unit* wurde in den CO₂-Inkubator gestellt und die entsprechenden Anschlüsse für Elektrik und Luftzufuhr nach außen verlegt und mit einem PC verbunden (Abbildung

3-5). Der Pumpendruck und die Schaltvorgänge konnten mit Hilfe der Software *Pump Control* gesteuert werden. Es wurden 12 ml Medium gleichmäßig auf die zwei Reagenzienreservoirs aufgeteilt und diese wurden anschließend in die *Fluidic Unit* eingespannt.

3.2.2.1 Zellaussaat in Flusskammern

Für die Zellkulturversuche unter Flussbedingungen im Flusskammern-Pumpsystem wurden die HMEC-1 in der 2.-8. Passage in ibiTreat μ -Slides I^{0.6} Luer ausgesät. Es wurden 150 μ l mit einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Kanal ausgesät. Zu den unter dynamischem Fluss wachsenden Zellen wurden als statische Kontrolle HMEC-1 ohne Fluss kultiviert. Nach einer Stunde wurde vorsichtig Supplementmedium in die Reservoirs gefüllt und die Zellen über Nacht statisch kultiviert. Nach etwa 10 - 12 Stunden wurde das Medium aus den Reservoirs entfernt und gegen 150 μ l neues Supplementmedium ersetzt.

3.2.2.2 Anschluss der μ -Slides

Die in den Flusskammern gewachsenen HMEC-1 wurden zu Versuchsbeginn mikroskopisch auf vollständige Konfluenz untersucht. Je 4 μ -Slides wurden untereinander durch *Serial Connectors* und anschließend über das *Perfusion Set* mit der *Fluidic Unit* verbunden und im CO₂-Inkubator aufgebaut (Abbildung 3-5). Dabei durften keine Luftblasen eingeschlossen werden. Der genaue Vorgang ist in der Application Note 13 (Wagner, 2012a) beschrieben. Die Flussrichtung des Mediums wurde zur Auswertung der Zellausrichtung auf den Flusskammern vermerkt.

3.2.2.3 Software

HMEC-1 wurden für 24 Stunden unter laminarer Schubspannung von 15 dyn/cm² kultiviert. Zum Steuern der Flussrate wurde die Software *Pump Control* verwendet. Um einen Zellverlust durch zu hohe Anfangsschubspannung zu vermeiden, wurde eine Rampe mit zunehmender Schubspannung gefahren, um die Zellen an den Flussstrom zu gewöhnen (siehe Tabelle 3-1). Durch das Hintereinanderschalten mehrerer Slides kann es zu Differenzen zwischen dem eingestellten und dem tatsächlichen Volumenstrom kommen, was die Schubspannung beeinflussen kann. Daher wurde die Flussrate während der ersten Phase überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Kroutvar & von Guttenberg, 2012b).

Tabelle 3-1: Schubspannungs-Profil für HMEC-1

Stufe		Schubspannung [dyn/cm ²]	Flussrate [ml/min]	Zeitspanne [min]
1	Initiale	2	3,3	30 min
2	Phase	5	8,3	30 min
3		15	16,6	24 h

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation

Die RNA wurde mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche GmbH; Mannheim, Deutschland) isoliert.

Die konfluent gewachsenen HMEC-1 wurden zweimal mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gründlich gewaschen und anschließend in 10 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mithilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig von der Petrischale gelöst und in 15 ml Zentrifugationsröhrchen bei 1000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Reagenz 1 (*Lysis/Binding Buffer*) und kurzem vortexten wurde das Lysat in ein Filtertube überführt und für 30 Sekunden bei 8000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in das Reaktionsgefäß wurden 10 µl Reagenz 2 (DNase) sowie 90 µl Reagenz 3 (*DNA Incubation Buffer*) pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µl Reagenz 4 (*Wash Buffer 1* mit Ethanol) hinzugegeben und erneut für 30 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und es wurden 500 µl Reagenz 5 (*Wash Buffer 2* mit Ethanol) in das Reaktionsgefäß pipettiert und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtertube wurde in ein steriles und RNase freies Eppendorf überführt und mit 35 µl Reagenz 6 (*Elution Buffer*) benetzt. Nach anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm wurde das Filtertube entfernt und die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm mit einem NanoDrop 2000c Spektral-Photometer bestimmt. Eine $OD_{260/280} = 2,0$ entspricht einer 100 %igen Reinheit.

3.3.3 Reverse Transkription für cDNA-Synthese

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion erfolgte mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis-Kit von Bio-Rad, wobei pro Ansatz 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde. Das Kit verwendet eine modifizierte MMLV-Reverse Transkriptase und eine Mischung aus oligo (dt)- und randomhexamer-Primern für die reverse Transkription. In einem Zwei-Schritte-Protokoll wird aus der isolierten Gesamt-RNA die für die PCR benötigte cDNA synthetisiert.

Entsprechend dem beigelegten Protokoll wurde zunächst 1 µg RNA zu dem in Tabelle 3-2 beschriebenen Reaktionsansatz hinzugegeben.

Tabelle 3-2: iScript-Reaktionsansatz

Komponenten	Volumen pro Reaktion
5x iScript Reaktions-Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease-freies Wasser	X µl
RNA Template (1µg)	X µl
Gesamtvolumen	20 µl

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler nach dem Thermoprofil von Tabelle 3-3 inkubiert.

Tabelle 3-3: iScript Thermoprofil

PCR-Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Anlagerung	25	5
Synthese	42	30
Denaturierung	85	5
Lagerung	4	∞

3.3.4 PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass mit zwei spezifischen *Primern* (= Oligonukleotide) in mehreren Zyklen der Bereich eines DNA-Moleküls, der zwischen den Primern liegt, mit einer hitzestabilen Polymerase amplifiziert wird. Einer der sequenzspezifischen *Primer* lagert sich als *sense Primer* auf dem Plus-Strang der DNA an, der andere als *antisense Primer* auf dem Minus-Strang. Die Synthese wurde in dieser Arbeit von der *Taq*-Polymerase katalysiert. Diese stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, welches im Wasser heißer Quellen lebt und gehört zu den am häufigsten verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerasen (Saiki et al. 1988). Die *Taq*-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum bei 72-74 °C und ist bei Temperaturen um die 94 °C noch stabil. Aufgrund der Hitzestabilität ist es ausreichend, das Enzym nur einmalig zuzusetzen, da die Polymerase während aller weiteren PCR-Schritte aktiv bleibt.

Tabelle 3-4: Verwendeter *sense- und antisense-Primer*

Primer	Sequenz
hGAPDH fwd	5' - GTGGATGGCCCCCTCCGGGAA - 3'
hGAPDH rev	5' - GCAGCGCCAGTAGAGGCAGG - 3'
heNOS fwd	5' - CAGAGCCCTGGCCTTTTC - 3'
heNOS rev	5' - GAAGGCTGGCATCTGGAA - 3'
hMyhHC fwd	5' - CCTCAAGCTGCGGAACTG - 3'
hMyhHC rev	5' - TGCAGCAGTGGCTTCACTT - 3'
hCaveolin-1 fwd	5' - CTCCTTGGTGTGCGCGTCTCGT - 3'
hCaveolin-1 rev	5' - TCCCATCCGGGAACAGGGCA - 3'
hK_{Ca}3.1 fwd	5' - ACGTCTCTTTCTTGCTCTGCCCC - 3'
hK_{Ca}3.1 rev	5' - TCCCCAGCTCCCCCTTTTGAGA - 3'
hK_{Ca}2.3 fwd	5' - GAGCGTCAAGATGGAAACAGA - 3'
hK_{Ca}2.3 rev	5' - ATCTTGGAAAGGTCCACCAG - 3'
hTRPV4 fwd	5' - GGCAAATCCCAGACACTACAGAA - 3'
hTRPV4 rev	5' - ATGCGCCACCATTTTTGG - 3'

Tabelle 3-5: Übersicht über die zu erwartenden Produktlängen (bp)

<i>cDNA</i>	Produktlänge (bp)
GAPDH	80
eNOS	66
MyhHC	60
Caveolin-1	97
K _{Ca} 3.1	70
K _{Ca} 2.3	66
TRPV4	100

Es wurden 2,5 µl der jeweiligen cDNA mit H₂O, 10x *Taq*-Puffer, dNTP-Mix, MgCl₂, *Taq*-Polymerase und entsprechendem *sense*- und *antisense*-Primer (Tabelle 3-4) versetzt. Die Konzentrationen und pipettierten Volumina sind in Tabelle 3-6 zu finden.

Tabelle 3-6: PCR-Bedingungen

Mastermixkomponente	Pipettierte Menge [µl]
H ₂ O	14,25
10x <i>Taq</i> -Puffer	2,5
MgCl ₂	2,5
dNTP-Mix (je 10 mM)	1
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ µl)	0,25
<i>sense</i> -Primer (10 µM)	1
<i>antisense</i> -Primer (10 µM)	1
cDNA (1:1000)	2,5

Da es sich bei der Denaturierungs- (94°C) und Elongationstemperatur (72°C) um konstante Temperaturen handelte, wurde nur die *Annealing*temperatur (60°C) den verwendeten Primerpaaren angepasst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 3-7: PCR-Programm

PCR-Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung (1x)	95	3
Denaturierung	94 60 72	0,5 1 1
Annealing		
Elongation		
Terminale Elongation	72	2
Nach Beenden der Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4°C abgekühlt		

3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente zwischen 300 bp bis 20 kb nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch ein konstant angelegtes elektrisches Feld wandert die negativ geladene DNA in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist direkt proportional zu der Größe des DNA-Fragmentes. Die DNA-Banden können anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Dabei lagert sich dieses spezifisch an die DNA an und bildet einen Komplex, welcher im UV-Licht fluoresziert.

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten mit einem Molekulargewicht zwischen 0,5 - 7 kb erfolgte in horizontalen Gelen mit einer Agarosekonzentration von 1,0 - 1,5 %. Als Elektrophoresepuffer, wie auch zum Lösen der Agarose diente 1x TAE-Puffer. Je 20 µl DNA-Probe wurde mit 6x DNA-Auftragspuffer versetzt, dessen Bromphenolanteil gleichzeitig die Lauffront der Elektrophorese erkennen ließ. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde ein 1 kb-DNA-Ladder Fragmentlängenstandard (Fermentas, St. Leon-Rot) grundsätzlich mitgeführt. Die Trennung erfolgte bei 80-120 V und 100 mA für etwa 1 h. Nach der Auftrennung wurden die Gele 20 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in 1x TAE Puffer) inkubiert. und anschließend ca. 10 min in Wasser gewaschen, bis überschüssiges EtBr entfernt war. Die gefärbten DNA-Banden wurden im UV-Transilluminator *Gene Genius* von Syngene (Cambridge; Grossbritannien) durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

Um einen Proteinabbau durch Proteasen zu verhindern, wurden alle Arbeiten mit Proteinen entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

3.4.1 Zellernte

Die Kulturflaschen wurden dem Brutschrank entnommen und der Zellrasen sofort mit 4°C kaltem PBS-Puffer gewaschen. Reste des Puffers wurden möglichst vollständig abgesaugt. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen und zu lysieren, wurden diese mit 500 µl 1x Lysepuffer mit Zusätzen (bei 56 cm² Wachstumsfläche) versetzt. Der Puffer wurde zügig auf dem Flaschenboden verteilt und die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Lysatansatz wurde für 30 min rotierend inkubiert.

3.4.2 Präparation von Gesamtproteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Für die Präparation von Gesamtproteinextrakten erfolgte nach der Zelllyse eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min. Der Überstand wurde bis auf 200 µl abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde das Pellet 30 sec mit Ultraschall (5 % cycle; 10 % Energie) behandelt. Dies geschah vorrangig, um Membranreste und Nukleinsäuren mechanisch zu zerstören und daran assoziierte Proteine abzulösen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Das Zelllysate wurde mit 4x *Roti-Load1* (Verhältnis 1:4) versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Das restliche Lysat konnte direkt für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden.

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht darauf, dass das Absorptionsmaximum von *Coomassie Brilliant Blue* G-250 in sauren Lösungen abhängig von der Proteinkonzentration von 465 zu 595 nm verschoben wird (Bradford, 1976). Zur Durchführung der Methoden nach Bradford wurde der *BioRad Protein Assay* verwendet. Die Protein Assay-Lösung wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und 1 ml in einer Messküvette vorgelegt und zwischen 1 µl und 5 µl Proteinlösung

hinzugegeben. Parallel zu den Proben werden Standards mit definierten Proteinkonzentrationen (50, 100, 200, 300, 400 µg BSA/ml) gemessen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm im Nanodrop 2000c gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben kann dann anhand der Eichgerade bestimmt werden.

3.4.4 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Diese Methode wurde ursprünglich von Lisanti und Mitarbeitern entwickelt und macht sich die charakteristische Eigenschaft von Caveolae zu Nutze, bei 4°C unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien (z.B. 1 %-iges Triton X-100) zu sein (Song et al. 1996; Lisanti et al. 1994). Da die Verwendung von Triton X-100 die Struktur nativer Proteine und Membranen verändern kann und somit die Bildung von intramembranösen Artefakten begünstigt, wurde für die Isolation der caveolären Membranen eine Detergenz-freie Methode angewendet, die von Song und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde (Song et al. 1996). Diese besteht darin, den Aufschluss der Zellen in Natriumcarbonat-Puffer bei einem pH-Wert von 11 durchzuführen.

Zunächst wurden die konfluent gewachsenen HMEC-1 zweimal mit eiskaltem PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und mit 2 ml eiskalter Natriumcarbonatlösung (500 mM Na_2CO_3 ; pH 11.0) pro Zellkulturschale ersetzt. Die Zellen wurden sodann mit einem Zellschaber vom Schalenboden vorsichtig abgeschabt (um ein Aufplatzen der Zellen zu vermeiden). Die Zellsuspension wurde anschließend in einer 1 ml Spritze mit 26 G Kanüle mit hohem Druck fünfmal resuspendiert. Um die Zelltrümmer, Kerne und noch ungebrochene Zellen zu entfernen, wurde das Homogenisat erneut bei 1.500 x g (4°C, 15 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde erst im Verhältnis 1:1 mit einer 90 % (w/v) Sucroslösung in MBS-Puffer (25 mM MES; pH 6,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) vermischt, bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde in ein gekühltes Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und anschließend mit 35 % und 5 % Sucroslösung in MBS-Puffer überschichtet, so dass ein Dichtegradient bestehend aus drei Schichten (jeweils 4 ml) mit 45 %, 35 % und 5 % Sucroseanteil aufgebaut werden konnte. Nach Ultrazentrifugation bei 38000 rpm und 4°C für 16-20 h in einem SW41 Rotor ohne Bremsen wurden 13 Fraktionen zu je 1 ml abgenommen und mittels SDS-Page und Western Blot auf die Caveolin-Verteilung hin analysiert. Die Membranmikrodomänen reichern sich unter diesen Bedingungen aufgrund ihrer geringen Dichte an der Grenze der 5 %- und 35 %-Schicht an, während lösliche Proteine (zytosolische und

solubilisierter Membranproteine) in den unteren 45 %-Schichten des Gradienten verbleiben.

3.4.5 Präzipitation von Membranproteinen

Die Fällung von Proteinen dient deren Aufreinigung und Konzentrierung. Eine häufig eingesetzte Methode, um Proteine aus Lösungen auszufällen, ist die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). Die proteinhaltigen Lösungen wurden auf eine Endkonzentration von 10 % (w/v) TCA eingestellt und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet 3x mit eisgekühltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Die Zentrifugation wurde jeweils für 1 min bei 13000 x g durchgeführt. Die Sedimente wurden in alkalischem SDS resuspendiert, mit 4x *Roti-Load* versehen und bei 95°C für 10 min denaturiert.

3.4.6 (Ko-)Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation wird das gewünschte Protein aufkonzentriert, indem es mittels spezifischer Antikörper in kleinen Mengen aus Zelllysaten isoliert wird. Die Methode der Ko-Immunpräzipitation wird zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen *in vivo* verwendet (Berggard et al. 2007). Ein spezifischer Antikörper gegen das Protein selbst oder gegen ein *Epitop-tag* des Proteins, wird z.B. an immobilisierte Protein G Dynabead gebunden, zum Zellextrakt gegeben und bindet über seinen konstanten Fc-Teil das Protein. Der Komplex wird gewaschen und eluiert. Anschließend können die isolierten Proteine über SDS-Gelelektrophorese und Western Blot nachgewiesen werden.

Für die Immunpräzipitation wurden 500 µl Gesamtproteinextrakt mit 10 µl des entsprechenden Antikörpers versetzt und für 4 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden 40 µl *Dynabeads*-Lösung in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, und dieses in ein Magnetgestell gegeben, in welchem sich die Dynabeads an der Wand des Reaktionsgefäßes sammelten, die dem Magneten zugewandt war, wodurch der Überstand mit einer Pipette leicht entfernt und verworfen werden konnte. Dann wurde das Antikörper-Gesamtproteinextrakt hinzugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße wieder in ein Magnetgestell gegeben und der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je 37,5 µl des Überstandes wurden mit 12,5 µl

4x *Roti-Load* versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Die *Dynabeads* wurden 4x mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen und anschließend erfolgte die Zugabe von 37,5 µl Lysepuffer + 12,5 µl 4x *Roti-Load*. Die Proben wurden 10 min bei 95°C erhitzt und abschließend kurz an zentrifugiert.

3.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht auf (Laemmli, 1970). Das im 4x *Roti-Load* enthaltene β-Mercaptoethanol denaturiert die Proteine und inhibiert Quartärstrukturen. Dabei bindet das negativ geladene SDS an die Proteine und der SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zur Anode und wird dabei durch den Siebeffekt der Polyacrylamid-Matrix ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden aufgrund des Molekulargewichtes des zu analysierenden Proteins ein 5 %-iges Sammelgel und ein 8 oder 12 %-iges Trenngel (Tabelle 3-8) verwendet. Als Größenstandard diente *Prestained Protein Marker* (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 kDa). Das Sammelgel lief bei 15 mA pro Gel, das Trenngel bei 20 mA pro Gel (100-200 Volt). Die Elektrophorese erfolgte, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot (Abschnitt 3.4.8) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Tabelle 3-8: Trennbereiche von Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentration

Polyacrylamid %	Optimaler Trennbereich [kDa]
4	80 – 220
6	60 – 200
8	40 – 100
10	20 – 70
12	20 – 60
15	10 – 40

3.4.8 Western Blot und Immundetektion

Der Western Blot ist eine immunologische Methode, um spezifisch geringe Mengen eines denaturierten Proteins nachzuweisen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine per SDS-PAGE folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran via *Complet-wet* Transfer (*Blotting*). Hierbei wird das Blotting-Sandwich zwischen die zwei Elektroden der *Complet-wet* Blotting Apparatur gelegt und ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung des Gels angelegt. Dabei findet der Transfer der Proteine auf die Membran statt.

Das Gel, die Membran und je 2 Filterpapiere wurden zur Äquilibration 5 min in Blotpuffer gelegt. Geblottet wurde für 90 min bei 250 mA. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran mit 1x TBS/T abgespült und die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 10 ml 5 %-igem Milchpulver in 1x TBS/T für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken blockiert. Nach dem Blocken wurde die Membran über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken in einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch für das Protein ist bzw. der eine hohe Affinität zu einem bestimmten Antigen auf dem Protein besitzt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x mit 1x TBS/T für je 10 min gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken in dem Sekundärreagenz inkubiert, das den ersten Antikörper spezifisch erkennt. Die Membran wurde erneut 3x für je 10 min mit 1x TBS/T gewaschen.

In den Tabelle 2-3 und

Tabelle 2-4 sind die verwendeten Primärantikörper und Sekundärreagenzien aufgelistet. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch 1-minütige Inkubation der Membran mit der Substratlösung *Super Signal West Dura Extended* (1 ml pro Membran) aktiviert, woraufhin für 1-30 min die Belichtung im *FUSION-FX7 Advance-Superbright* (4.2/10 Mio Pixel CCD-Kamera) erfolgte.

Sollte die Membran ein weiteres Mal gefärbt werden, wurde diese 3x 10 min mit TBS/T gewaschen und 30 min mit etwa 10 ml *Strippingpuffer* inkubiert. Anschließend wurde sie erneut 3x 10 min mit 1x TBS/T gewaschen und anschließend blockiert, nacheinander mit Primärantikörper, mit Sekundärreagenz und Substratlösung inkubiert und wieder belichtet.

3.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung dient zur spezifischen Markierung von Proteinen, um deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu bestimmen. Dabei interagiert ein Antikörper spezifisch mit dem Epitop des zu lokalisierenden Proteins. Anschließend wird dieser Primärantikörper durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert und für die Mikroskopie sichtbar gemacht. Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden im Mikroskop durch entsprechende Exzitationswellenlängen angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Emissionswellenlänge.

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung für Mikroskopie

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten HMEC-1 wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden sie erneut 3x mit PBS gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt, wo alle weiteren Schritte vollzogen wurden. Die PFA fixierten Proben wurden dann für 10 min bei RT mit 0,1 % Triton-X in PBS permeabilisiert und erneut 3x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Blockung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei RT in 20 % Ziegenerum in PBS. Nach dem Blocken wurden die Zellen erneut 3x mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper in 20 % Ziegenerum in PBS inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen wurden die Proben für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in 20 % Ziegenerum in PBS behandelt. Nach einem erneuten PBS Waschschrift wurden die Proben mit *ProLong Gold antifade Reagenz* mit DAPI eingedeckelt. Die Präparate wurden bis zur Untersuchung unter dem Mikroskop bei 4°C gelagert.

Die Antikörpervedünnungen für die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2-3: Primäre Antikörper aufgelistet.

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung für die GSDIM-Mikroskopie

Für die GSDIM-Mikroskopie wurden die Zellen in Ibidi μ -Slides I^{0.6} Luer ibiTreat kultiviert. Die Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass keine Eindeckelung mit *ProLong Gold antifade Reagenz* mit DAPI erfolgte, sondern die Slides mit PBS befüllt und bei 4°C gelagert wurden.

3.6 Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen

3.6.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

In dieser Arbeit wird das inverse Auflichtmikroskop Axiovert 100 (Carl ZeissAG, Oberkochen) verwendet. Um die Bilder später objektiv auswerten zu können, werden sie mittels der Kamera AxioCam Color (Carl Zeiss AG, Oberkochen), die auf das dafür vorgesehene Kameraokular aufgesetzt werden kann, abfotografiert und mit Hilfe der zugehörigen Software Axio Vision 3.1 gespeichert.

3.6.2 Hochauflösende Mikroskopie

Bei der GSDIM-Mikroskopie (*ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*) handelt es sich um eine hochauflösende Mikroskopiertechnik, bei der unter optimalen Bedingungen Auflösungen von bis zu 20 nm erzielt werden können (Fölling et al. 2008; Hell & Wichmann 1994). Dabei beruht das Prinzip des GSDIM Verfahren auf der Detektion einzelner, voneinander separierter emittierender Fluorophore (Steinhauer et al. 2008; Bretschneider et al. 2007).

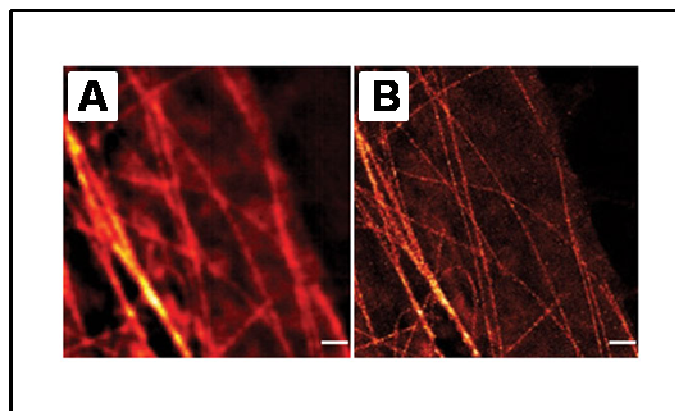


Abbildung 3-6: Mikrotubuli-Cytoskelett lebender PtK2 Zellen.

(A) Epifluoreszenz und (B) GSDIM Aufnahmen des Mikrotubuli-Cytoskeletts von lebenden PtK2 Zellen gefärbt mit Citrine-Map2. Maßstabsbalken 1 μm . Modifiziert nach (Fölling et al. 2008).

In der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie werden delokalisierte π -Elektronen im Fluoreszenzfarbstoff von einem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 überführt (Abbildung 3-7). Sobald diese Elektronen zurück in den S_0 -Zustand fallen, wird Energie in Form von Fluoreszenzlicht abgegeben.

Bei der GSDIM-Mikroskopie wird nun mit Hilfe eines Hochleistungslasers ein Großteil der Elektronen in den sogenannten Dunkelzustand (D) versetzt. Diese im OFF-Zustand

befindlichen Elektronen kehren einzeln und spontan aus dem Dunkelzustand zurück in den Grundzustand S_0 . Während andere Elektronen nun in den OFF-Zustand überführt werden, fluoreszieren diese in den S_0 -Zustand zurückgebrachten Elektronen für einen kurzen Zeitraum. Es kommt zu einem Blinken im Präparat. Die genaue Lokalisation der Fluorophore wird über einen Algorithmus bestimmt. Zum Schluss entsteht ein hochauflösendes GSDIM-Bild, das aus vielen Einzelbildern errechnet wurde.

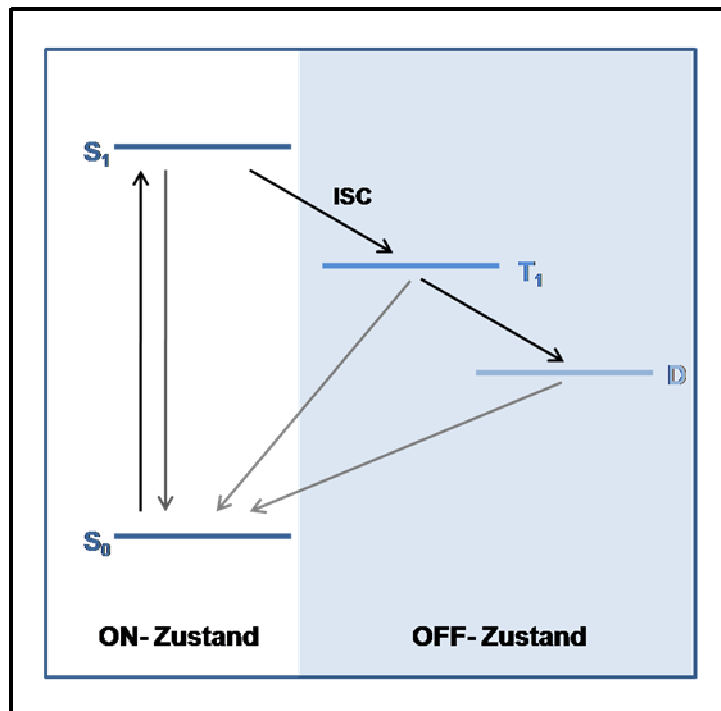


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des GSDIM-Prinzips auf Grundlage eines vereinfachten Jablonski-Diagrammes.

Delokalisierte π -Elektronen in Fluorophoren können sich in einem Grundzustand S_0 , einem angeregten Zustand S_1 (beides ON-Zustände) oder in einem Triplett (T_1) oder Dunkelzustand (beides OFF-Zustände) bewegen. Wenn Fluoreszenzlicht emittiert wird, zirkulieren die delokalisierten π -Elektronen zwischen Grundzustand S_0 und angeregtem Zustand S_1 . Im Gegensatz zu diesen ON-Zuständen, sind Fluorophore im OFF-Zustand nicht in der Lage, Licht zu emittieren. Dieser OFF-Zustand ist langlebig und nur durch eine Spinkkehr (intersystem crossing, ISC) möglich. Anschließend kehren einzelne Moleküle in den anregbaren Grundzustand zurück und fluoreszieren.

In dieser Arbeit wurden HMEC-1 in Ibidi μ -Slides I^{0.6} Luer kultiviert und, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, vorbereitet. Als Einbettmedium mit reduzierenden Bedingungen wurde frisch angesetztes PBS mit 10 % (w/v) Glucose, 0.5 mg/mL Glucose-Oxidase und 40 μ g/mL Katalase, eingestellt auf pH 7.4 genutzt und 150 μ l davon in den Kanal gegeben. Für die hochauflösenden Aufnahmen wurde ein Leica SR GSD (DMI 6000B TIRF) Mikroskop mit einem 100x Öl-Objektiv eingesetzt. Die verwendeten Fluorophore wurden mit Hochleistungslasern von 532 nm und 642 nm in den Dunkelzustand versetzt. Zusätzlich wurde ein 405 nm Laser verwendet, der die Fluorophore aus dem

Dunkelzustand schneller in den S0 Zustand zurückholt. Für die Bildbearbeitung wurde die LAS AF GSD Software verwendet.

3.7 Tierhaltung, Tierzucht und Genotypisierung

Die für diese Arbeit benötigten Tiere wurden in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität Marburg unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen gezüchtet. Es wurden maximal sechs Tiere gemeinsam in einem IVC (*individual ventilated cage*) System bei einer konstanten Temperatur von 22 °C (± 2) und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Zur Ernährung dienten Standardnagerkost (0,25 % Natrium, SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Nachkommen wurden spätestens 23 Tage *post partum* von der Mutter entwöhnt und nach ihrem Geschlecht getrennt. Das Geburtsdatum, das Elternzuchtpaar, das Geschlecht, die Generation und der Genotyp wurden auf der Käfigkarte dokumentiert.

Die Genotypisierung der Tiere für das Caveolin-1-Gen wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach dem Handbuch von Jackson Laboratory mit den Primern Wildtyp *forward*, Mutante *forward* und Mutante *reverse* (Sequenz siehe Tabelle 3-10) ausgeführt. Dazu wurde zunächst ein etwa 8 mm langes Schwanzstück der Mäuse mit 200 μ l Lysepuffer (50 mM NaOH) bei 100 °C für 30-50 Minuten auf dem Thermomixer inkubiert. Danach wurde den Proben 50 μ l Neutralisierungspuffer (1 M Tris-HCl) zugegeben. So vorbereitet war es möglich, die Proben bei 4 °C aufzubewahren.

Die verwendeten Primer waren folgende:

Tabelle 3-9: Verwendeter *sense- und antisense-Primer* für Caveolin-1 Genotypisierung

Primer	Sequenz
Wildtyp Cav fwd	5' - G T G T A T G A C G C G C A C A C C A A G - 3'
Mutante Cav fwd	5' - C T A G T G A G A C G T G C T A C T C C - 3'
Rev	5' - C T T G A G T T C T G T T A G C C C A G - 3'

Als Template wurde 1 μ l Lysat aus der Schwanzspitze der Tiere mit H₂O, 10 x γ -Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, Taq-Polymerase und entsprechendem *sense- und antisense-Primer*

(Tabelle 3-9) versetzt. Die Konzentrationen und pipettierten Volumina sind in Tabelle 3-11 zu finden. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (GeneAMP2700, ABI system, USA) mit dem in Tabelle 3-10 beschriebenen PCR-Programm durchgeführt:

Tabelle 3-10: PCR-Programm für Caveolin-1 Genotypisierung

PCR-Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung (1x)	95	3
Denaturierung	94	0,5
<i>Annealing</i>	65	0,5
Elongation	72	1
Denaturierung	94	0,5
<i>Annealing</i>	65	0,5
Elongation	72	1
Terminale Elongation	72	10

Nach Beenden der Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4 °C abgekühlt

Tabelle 3-11: PCR-Bedingungen für Caveolin-1 Genotypisierung

Mastermixkomponente	Pipettierte Menge [µl]
H ₂ O	9,62
10x Taq-Puffer	1,56
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,62
MgCl	1,56
Taq-Polymerase (5 U/ µl)	0,16
<i>sense-Primer</i> (10 µM)	0,24
<i>antisense-Primer</i> (10 µM)	0,24
Template	1

Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1 %-igen Agarose-Gel durch Elektrophorese aufgetrennt und die Größe mit Hilfe eines Größenstandards (DNA-Sizer 100 bp, Fermentas) bestimmt. Die Banden wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid mit UV-Licht sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde bei jedem PCR-Experiment ein Leerwert, d.h. das Reaktionsgemisch ohne Zusatz von DNA, mitbestimmt.

Bei dem *Knockout*-Gen wurden Exon1, Exon2 und ein Teil der Promotor Region (insgesamt 2.2 kb große Region) durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Somit ergab die Multiplex-PCR ein Produkt von 690 bp bei den Wildtyp-Tieren und ein Produkt von 410 bp bei Caveolin-1-*Knockout*-Tieren. Wiederum wurden Proben, bei denen beide Banden zu sehen waren, als heterozygot eingeordnet.

Am Versuchstag wurden die Tiere aus der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums in das Labor gebracht. Nach der Bestimmung des Körpergewichts wurden die Tiere in tiefer Ätherinhalationsnarkose getötet. Zur Endothelzellisolation wurde die *Arteria carotis communis* (A.c.c.) entfernt und kurz in PBS-Puffer im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert. Für die Untersuchung am Druckmyographen wurden die linke und die rechte A.c.c. unter einem Stereomikroskop vorsichtig unter Vermeidung einer Überdehnung herauspräpariert und in eine gepufferte Salzlösung (PSS) überführt und bis zur Untersuchung am selben Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.8 Elektrophysiologische Patch-Clamp Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Patch-Clamp Untersuchungen wurden federführend von Herrn Dr. Michael Kacik durchgeführt. Ich wurde in diese Arbeiten mit einbezogen.

3.8.1 Grundprinzip

Um auf zellulärer Ebene die Funktion von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ zu untersuchen und Auswirkungen der verschiedenen Genotypen der Versuchstiere auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellmembran nachzuweisen, wurde die Patch-Clamp Technik eingesetzt.

Die Patch-Clamp Technik wurde 1976 von den Physiologen Neher und Sakmann erstmalig beschrieben (Neher, Sakmann 1976). Es handelt sich um eine Messmethode in der Elektrophysiologie, die es ermöglicht, sowohl das Membranpotenzial von Zellen

als auch die Aktivität einzelner Ionenkanal-Proteine zu untersuchen (Numberger, Draguhn 1996). Dabei können die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen verändert werden und mit aktivierenden und inhibitorischen Substanzen kann die Aktivität der Ionenkanäle spezifisch beeinflusst werden. Das Membranpotential wird mit Hilfe der Spannungsklemme auf einen definierten Wert eingestellt. Durch das Öffnen oder Schließen der Ionenkanäle wird vom Verstärker ein Kompensationsstrom erzeugt, der genau so groß ist wie der durch die Membran fließende Strom. Der gemessene Kompensationsstrom ist ein indirektes Maß für die Aktivität der betreffenden Ionenkanäle. In dieser Arbeit wurden die Patch-Clamp-Untersuchungen im Ganzzellstrom-Messmodus (*whole-cell*) durchgeführt.

3.8.2 Whole-Cell-Modus

In der Konfiguration des *Whole-Cell*-Modus ist die Messung der Ganzzellströme über die Spannungsklemme möglich. Mit Hilfe des Mikromanipulators wird die Mikropipette so positioniert, dass die Spitze (Durchmesser ca. 1 μm) die Zellmembran berührt. Anschließend wird in der Mikropipette ein Unterdruck erzeugt, wodurch ein kleiner Membranbereich, der sogenannte *Patch*, an der Spitze angesaugt wird. Hierbei entsteht ein sogenannter *Seal*, eine hohe elektrische Abdichtung, die zu einer elektrischen Isolierung des Membranpatches von der Umgebung führt (hoher elektrischer Widerstand, über 1 G Ω).

Um in den *Whole-Cell*-Modus zu gelangen, wird nach Erreichen dieses *Giga-Ohm-Seal* ein starker Unterdruck angelegt und der angesaugte Membranbereich aus der Zelle herausgerissen. Dies ermöglicht einen direkten elektrischen Zugang der Patchpipette mit der Elektrode zum Zytoplasma, während die Badelektrode im Experimentierbad liegt. Die dann registrierbaren Ströme entsprechen der Summe der Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran.

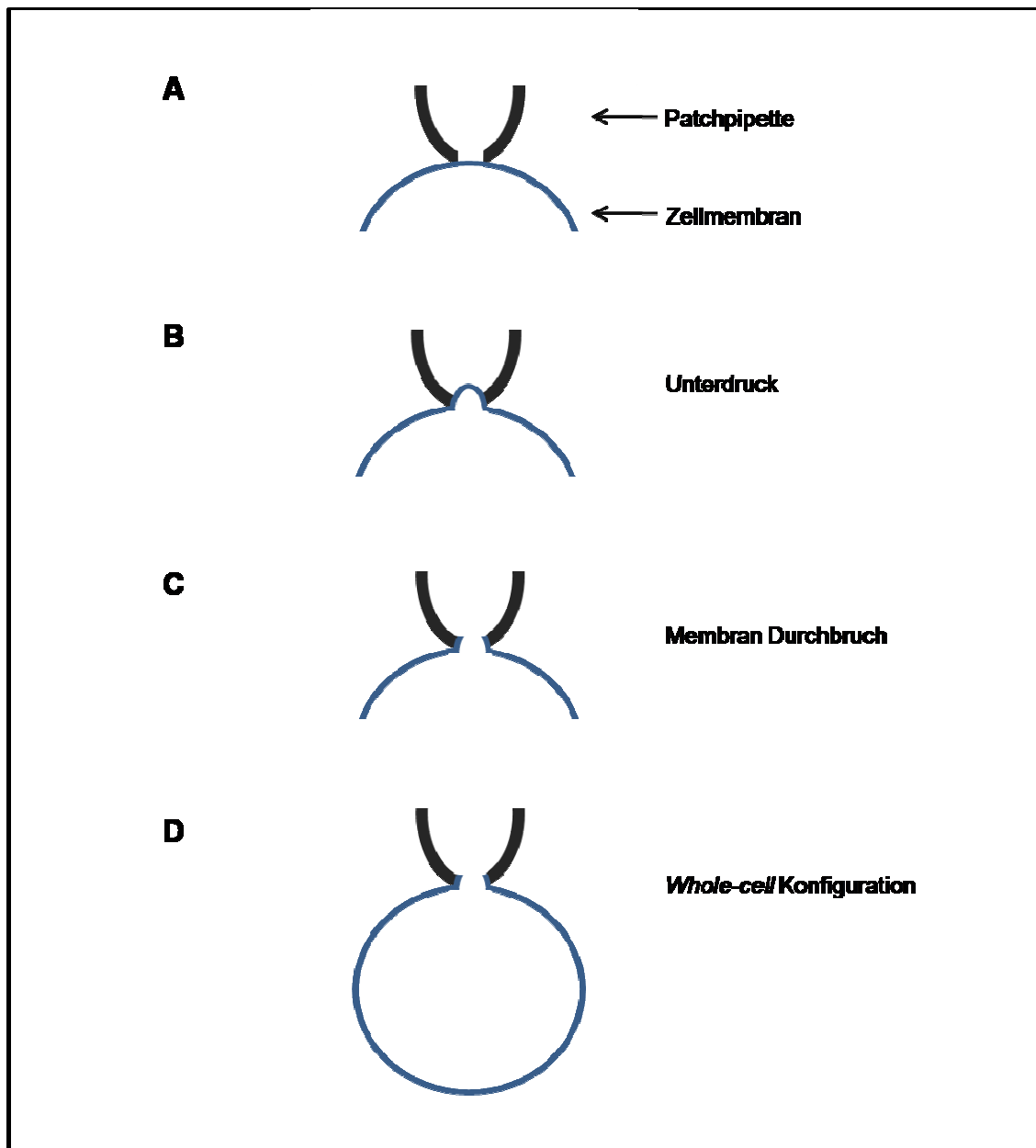


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung des Whole-Cell-Modus bei der Patch-Clamp-Untersuchung.

(A) Zunächst berührt die Spitze der Mikropipette (Durchmesser ca. 1 μm) die Zellmembran. (B) Anschließend wird an die Mikropipette ein Unterdruck angelegt, wodurch ein kleiner Bereich der Membran, der sog. „Patch“, angesaugt wird. Dieser wird dadurch elektrisch isoliert (hoher elektrischer Widerstand, über 1G Ω). (C) Nach Erreichen des Giga-Ohm-Seal gelangt man zum Whole-Cell-Modus, indem durch Anlegen eines kurzen Unterdruckes der angesaugte Patch herausgerissen wird. (D) Es entsteht ein direkter Zugang der Patchpipette mit der Elektrode zum Zytoplasma, während die Badelektrode im Experimentierbad liegt. Modifiziert nach (Hamill et al.1981).

3.8.3 Versuchsaufbau

Das Mikroskop und die Messanordnung wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Ein Faradaykäfig diente der elektrischen Abschirmung des Messplatzes und alle leitenden Komponenten wurden über einen gemeinsamen Massepunkt

geerdet. Das Experimentierbad wurde auf dem Objekthalter eines inversen Mikroskops (Axiovert, Fa. Zeiss) befestigt. Die Patchpipetten wurden mit einem automatischen Pipettenziehgerät in drei Zugintervallen aus 7,5 cm langen polierten Borosilikatkapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Wandstärke 0,3 mm) hergestellt. Der elektrische Widerstand der so erhaltenen Patchpipetten betrug 2-4 M Ω in symmetrischer KCl-Lösung. Anschließend wurden die Pipetten in der Pipettenhalterung eines Mikromanipulators befestigt, mit dem eine genaue Bewegung und Positionierung der Patchpipette in alle drei Raumebenen möglich war. Als Mess- und Referenzelektrode diente ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl-Elektrode). Der Druck der Patchpipette wurde über ein Schlauchsystem variiert.

3.8.4 Aufbau des elektrischen Messkreises

In Abbildung 3-9 ist der schematische Aufbau des Messkreises wiedergegeben.

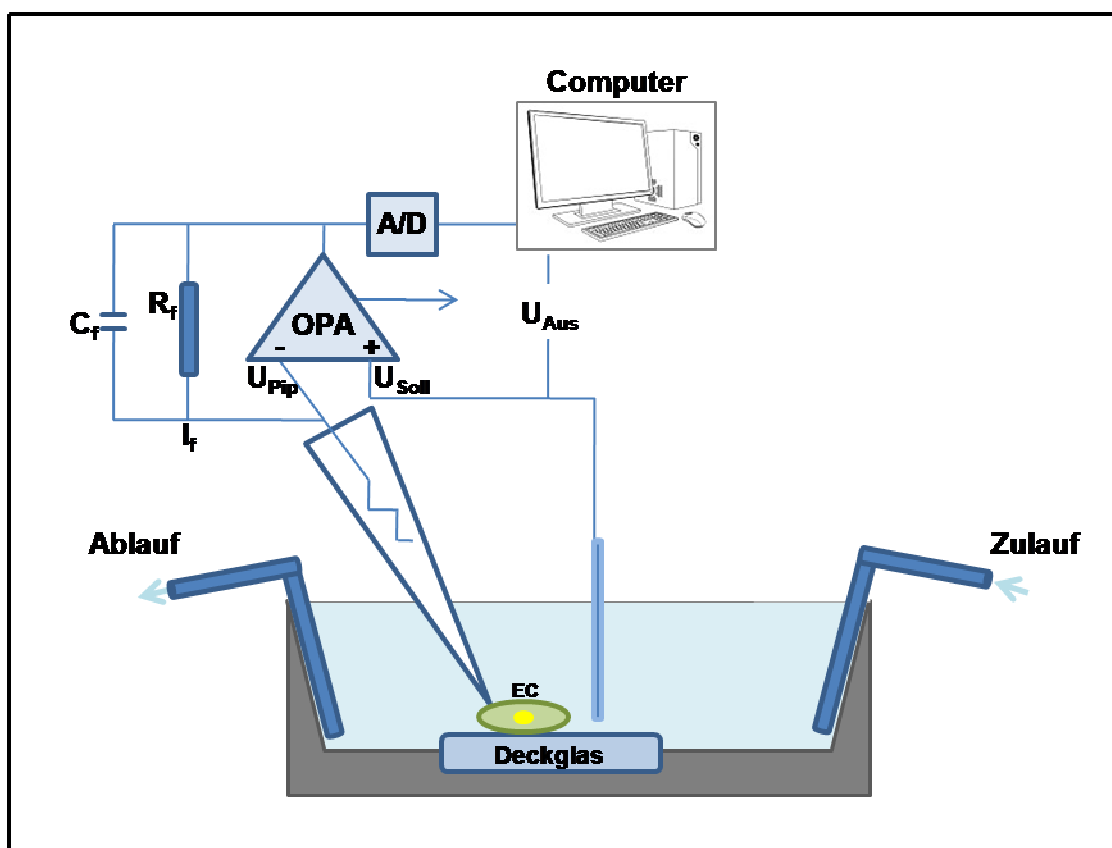


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des Patch-Clamp Messkreises.

(OPA) Operationsverstärkers, (A/D) Analog/Digital-Wandler, (C_r) Referenzkapazität, (I_r) Referenzstrom, (I_m) Messstrom, (R_r) Referenzwiderstand, (U_{Pip}) Pipettenspannung, (U_{Soll}) Sollspannung, (U_{Aus}) Ausgangsspannung, (EC) Endothelzelle.

Die Spannungen der Pipette U_{Pip} sowie die vorgegebene Sollspannung U_{Soll} liegen an den beiden Eingängen des Operationsverstärkers (OPA = *operation amplifier*) an. Besteht zwischen Pipetten- und Sollpotential eine Differenz, so liegt am Ausgang des OPA die Ausgangsspannung (U_{Aus}) an. U_{Aus} ist proportional zu der Differenz von U_{Pip} und U_{Soll} , deren Absolutwert jedoch verstärkt ist. Der Eingang des OPA ist über einen Rückkopplungswiderstand R_f mit seinem Ausgang verschaltet. Kommt es zu einer Potentialdifferenz, muss durch R_f ein Strom fließen, da die Spannung zwischen Punkt 1 (U_{pip}) und Punkt 2 verschieden ist. An R_f entsteht eine Spannung, die proportional zum fließenden Strom ist ($U = R \cdot I$). Der Kompensationsstrom I_f wird gemessen und fließt so lange, bis ein Ausgleich der Spannungsdifferenz an den Eingängen des Operationsverstärkers erreicht ist (Numberger, Draguhn 1996).

3.8.5 Versuchsablauf

Zur Isolierung der Endothelzellen wurden den Versuchstieren die *Arteria carotis communis* entfernt und in eine Petrischale mit PBS-Puffer ohne Ca^{2+} überführt. Die Gefäße wurden unter dem Mikroskop in den Myographen eingespannt und die A.c.c. über die Glaskapillaren mit 0,05 % Trypsinlösung gefüllt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C, wurden die Endothelzellen ausgewaschen und unter sterilen Bedingungen in DMEM-Medium überführt. Die Endothelzellen wurden ca. 5 Stunden nach Isolation mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Die Patch-Clamp-Experimente im Whole-Cell-Modus wurden mit Hilfe von Michael Kacik vorgenommen. Zu Beginn des Experiments wurde, wie bereits beschrieben, die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Im Whole-Cell-Modus wurde die Messung der Ganzzellströme über die Spannungsklemme durchgeführt. Um später die Stromstärke in Beziehung auf die Zellgröße normieren zu können, wurde die Kapazität jeder Zelle bestimmt, welche im proportionalen Verhältnis zur Zellgröße steht (Numberger, Draguhn 1996). Zur Aktivierung der K_{Ca} -Ströme wurden die Zellen mit einer Pipettenlösung mit 3 mmol/L Ca^{2+} dialysiert. Um die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ identifizieren zu können, wurden die jeweiligen selektiven Blockersubstanzen TRAM-34 und UCL1684 (Konzentration jeweils 1 $\mu\text{mol/L}$) allein oder in Kombination in die Badlösung gegeben.

3.8.6 Datenaufzeichnung und Datenauswertung

Die Gesamtzellströme wurden mit dem Programm „Pulse“ (Fa. HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet. Hierbei wurden zur Messung von

Gesamtzellströmen Spannungsrampen von -100 mV bis $+100$ mV mit einer Dauer von 1 s verwendet (Köhler et al. 2000). Die Messdaten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert, mit dem Computer registriert und anschließend auf Festplatte gespeichert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm „Pulsefit“ (ebenfalls Fa. HEKA Elektronik). Zur Ermittlung der Stromstärke wurden Strom-Spannungskurven erstellt, sodass den angelegten Klemmpotentialen die gemessenen Stromwerte direkt zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe der ebenfalls bestimmten Zellkapazität, die ein proportionales Maß für die Zellgröße ist, erfolgte die Normierung des Stroms pro Flächeneinheit (Strom-Kapazitätsquotient in pA/pF).

3.9 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SE) des Mittelwerts angegeben. Gruppen und Subgruppen wurden durch Anwendung des ungepaarten t-Tests verglichen. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant, P-Werte $< 0,01$ als hochsignifikant erachtet.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Teilbereich werden zur Aufklärung der räumlichen Assoziation von K_{Ca} - und TRPV4-Kanälen in der endothelialen Caveolae Ergebnisse zur Genexpression, Lokalisation und Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1, TRPV4- und K_{Ca} -Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1, *human dermal microvascular endothelial cell*) beschrieben. Der zweite Teilbereich behandelt *in vitro* Experimente zur endothelialen Schubspannung und deren Einfluss auf die räumliche Assoziation des $K_{Ca}3.1$ -Kanals und Interaktionen mit Caveolin-1 und TRPV4 von kultivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Im dritten Teilabschnitt wird an frisch isolierten Endothelzellen aus der *Arteria carotis communis* (CAEC) der Maus gezeigt, welche Auswirkungen ein Fehlen des Strukturproteins Caveolin-1 *in vivo* auf die Funktion und Interaktion der K_{Ca} -Ströme hat.

4.1 Charakterisierung der Kompartimentierung der endothelialen Caveolae

Zu Beginn der Arbeit wurde mittels qualitativer RT-PCR die Expression von Caveolin-1, dem Strukturprotein der Caveolae, und der für die endothelabhängigen Vasodilatation wichtigen Kanäle TRPV4, $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ in mikrovaskulären Endothelzellen des Menschen (*human dermal microvascular endothelial cells*, HMEC-1) nachgewiesen. Für die Kompartimentierungsstudien der endothelialen Caveolae wurde mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation die caveoläre und die nicht-caveoläre Fraktion der HMEC-1 separiert und auf die Anwesenheit der einzelnen Komponenten untersucht. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt und mögliche Interaktionen der Proteine per Immunpräzipitation überprüft.

4.1.1 Expression von Caveolin-1, TRPV4 und den K_{Ca} -Kanälen $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Die Expression von TRPV4 und den K_{Ca} -Kanälen, $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$, wurde mit der Expression von Caveolin-1 auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Sobald die HMEC-1 eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht hatten, wurde eine RNA-Isolation mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche GmbH; Mannheim, Deutschland)

durchgeführt. Die isolierte RNA wurde anschließend für die in Kapitel 3.3.3 beschriebene cDNA-Synthese eingesetzt und durch eine RT-PCR (Kapitel 3.3.4) amplifiziert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente per Agarosegelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Eine erfolgreiche Isolierung der RNA wurde durch Nachweis von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), einem *Housekeeping*-Gen, belegt. Als Endothelzellmarker wurde die Expression von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) getestet. Myosin *heavy chain* ist ein klassischer Marker einer differenzierten, kontraktilen Gefäßmuskelzelle und wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

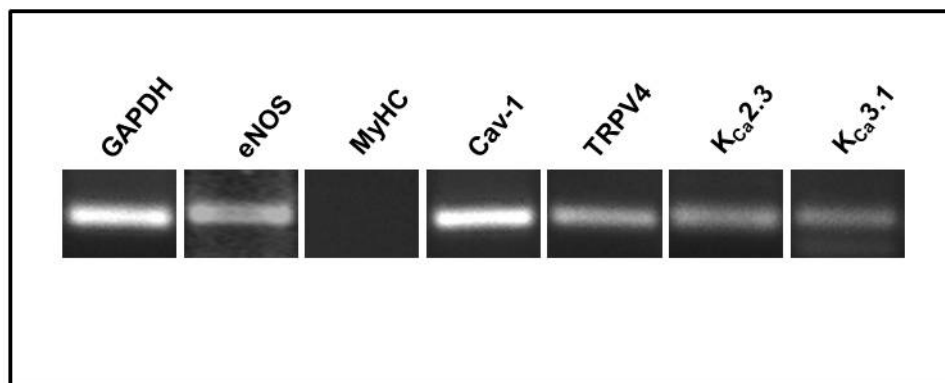


Abbildung 4-1: Expressionsanalyse mittels RT-PCR in HMEC-1.

Qualitative RT-PCR validiert die Expression des Endothelzellen-Markers eNOS, dem Strukturprotein Caveolin-1 und der Kationenkanäle TRPV4, K_{Ca}2.3 und K_{Ca}3.1 in HMEC-1. MyHC, das Markerprotein für glatte Gefäßmuskelzellen, wird in HMEC-1 nicht exprimiert.

In Abbildung 4-1 ist das Ethidiumbromid-markierte Gel mit entsprechenden RT-PCR-Produkten dargestellt. Es zeigte sich, dass in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) das Strukturprotein Caveolin-1 und die Kationenkanäle TRPV4, K_{Ca}2.3 und K_{Ca}3.1 exprimiert werden. Dabei amplifizierte die RT-PCR die erwarteten Produkte von 97 bp für Caveolin-1, 100 bp für TRPV4, 66 bp für K_{Ca}2.3 und 70 bp für K_{Ca}3.1. Zudem zeigte die Expression von eNOS (66 bp) und das negative Ergebnis von Myosin *heavy chain* (60 bp), dass es sich bei den verwendeten Zellen um eine reine Endothelzellkultur mit Endothel-spezifischen Eigenschaften handelt und es keine Kontaminationen mit glatten Gefäßmuskelzellen gab.

4.1.2 Anreicherung von TRPV4 und K_{Ca}2.3 in der caveolären Membranfraktion in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation wurden die verschiedenen Zellkompartimente auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe und Dichte durch mehrere Zentrifugationsschritte mit jeweils unterschiedlichen Sucrose-Dichtegradienten voneinander getrennt und deren Proteine in den jeweiligen Fraktionen angereichert. Die Membranen der Endothelzellen wurden nach mechanischer Zerkleinerung durch Ultraschall auf einem diskontinuierlichen 5 %, 35 % und 45 % Sucrose-Gradienten in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient in 13 gleich große Fraktionen (je 1 ml) aufgeteilt und gleiche Mengen Protein aus jeder Fraktion im Western Blot auf die Anwesenheit von Caveolin-1 überprüft.

Vorherige Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten mittels Western Blot, dass Caveolin-1, das Strukturprotein der Caveolae, in den Fraktionen 2 - 8 angereichert war, mit einem Maximum in den Fraktionen 2 - 3 (Goedicke-Fritz et al. 2015). In den Fraktionen 9 - 13 konnte kein Caveolin-1 nachgewiesen werden und wurde als nicht-caveoläre Fraktion beschrieben (Abbildung 4-2 (A)).

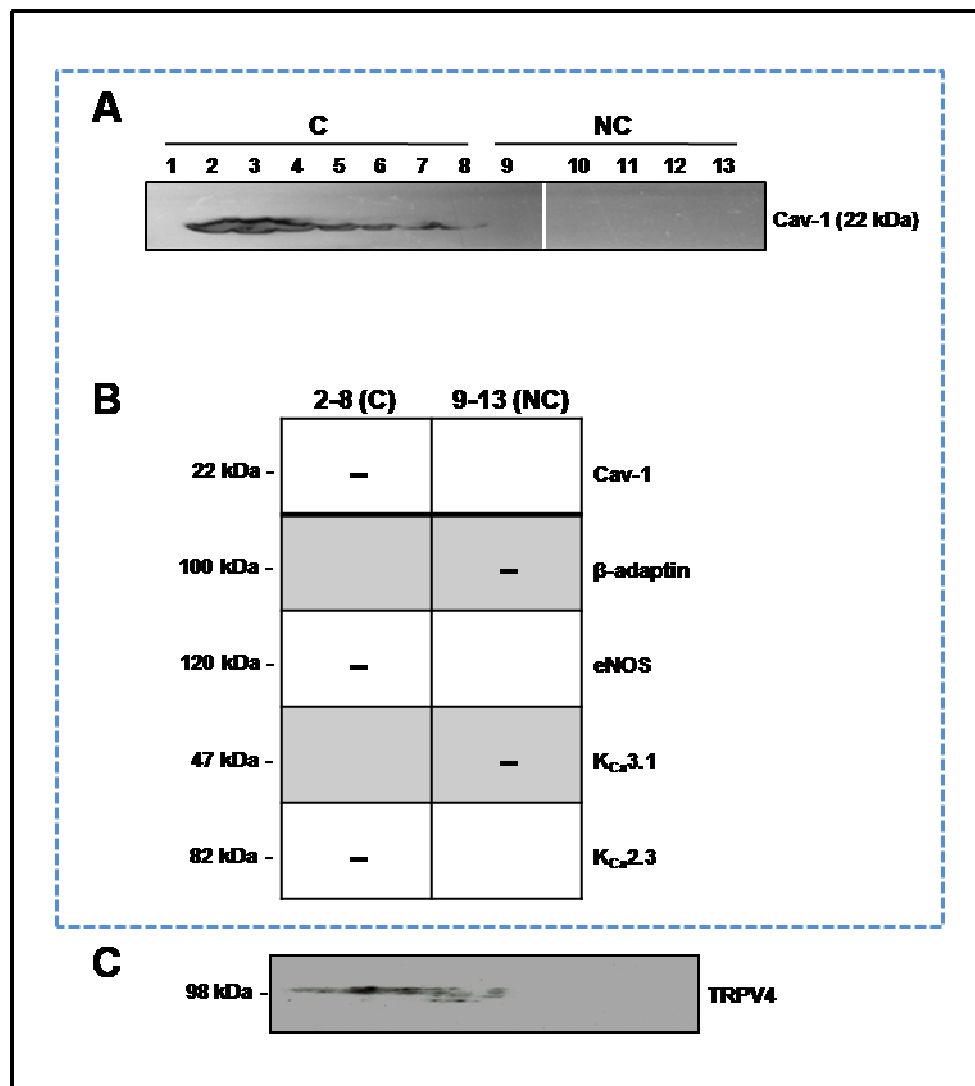


Abbildung 4-2: $K_{Ca}2.3$ und TRPV4-Kanäle sind in der Caveolae von humanen mikrovaskulären Endothelzellen angereichert.

(A+B) Modifiziert nach (Goedicke-Fritz et al. 2015) (A) Mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation wurde die nicht-caveoläre Membranfraktion (NC) von der caveolären Membranfraktion (C) getrennt und mittels Western Blot und Immunfärbung analysiert. Immunblot weist die Anwesenheit von Caveolin-1 (Caveolin-1) in den Fraktionen 2-8 nach. (B) Repräsentative Immunblots zeigen, dass $K_{Ca}2.3$ und eNOS aber nicht β -Adaplin und $K_{Ca}3.1$ in der caveolären Membranfraktion (Fraktionen 2-8) von HMEC-1 angereichert sind. (C) Auch der Calciumkanal TRPV4 ist in der caveolären Membranfraktion von HMEC-1 angereichert.

Wie in Abbildung 4-2 (B) dargestellt, zeigte sich zudem, dass $K_{Ca}2.3$ und eNOS in der caveolären Fraktion nachweisbar waren, wohin gegen $K_{Ca}3.1$ und β -Adaplin, ein nicht-caveolärer Marker (Sampson et al. 2004) in der nicht-caveolären Fraktion angereichert waren. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob TRPV4 in der caveolären oder der nicht-caveolären Fraktion angereichert ist. Abbildung 4-2 (C) zeigt, dass mittels Western Blot und anschließender Anti-TRPV4 Immunfärbung eine Bande für TRPV4 mit einer Größe von 98 kDa in der caveolären Fraktion detektiert wurde. In der nicht-

caveolären Fraktion war das Protein nicht nachweisbar. Zusammenfassend zeigt sich, dass auch der Calciumkanal TRPV4 in der caveolären Fraktion angereichert ist.

4.1.3 Räumliche Assoziation von Caveolin-1 mit $K_{Ca}2.3$ - und TRPV4-Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Die Caveoline, insbesondere Caveolin-1 (Caveolin-1), stellen ein essentielles Strukturprotein für die Kompartimentbildung bzw. die Bildung der Caveolae dar (Drab et al. 2001). Caveolin-1 konzentriert und organisiert spezifische Lipide (Cholesterol, Sphingomyelin) und Lipid-modifizierte Signalmoleküle, wie z.B. G-Proteine und eNOS in der Plasmamembran (Liu et al. 2002; Li et al. 1995), interagiert mit ihnen und ist mitverantwortlich für die Modulation von Signalsystemen. Da unsere biochemischen Daten einen ersten Hinweis lieferten, dass $K_{Ca}2.3$ und TRPV4, aber nicht $K_{Ca}3.1$ in der caveolären Fraktion angereichert sind, wollten wir mittels optischer Methode, der Immunfluoreszenz, die räumliche Assoziation der Kanäle mit Caveolin-1 bestimmen. Um die Verteilung in den HMEC-1-Zellen mittels herkömmlicher Immunfluoreszenzmikroskopie (Axio Observer Z.1 Mikroskop) untersuchen zu können, wurden HMEC-1 auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern kultiviert und anschließend fixiert. Anschließend wurde Caveolin-1 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und TRPV4 bzw. die K_{Ca} -Kanäle mit einem Alexa Fluor 555-Antikörper markiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation der Proteine anschließend verglichen. Als Kontrolle wurde der fluoreszierende Zweitantikörper alleine auf die HMEC-1-Zellen gegeben. Hier zeigte sich wie erwartet kein Signal.

Abbildung 4-3 (A-C) zeigt, dass Caveolin-1 vorwiegend in der Zellmembran humaner mikrovaskulärer Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, was der typischen Lokalisation der Caveolen entsprach. Zudem war es teilweise im Zytoplasma lokalisiert. Sowohl $K_{Ca}2.3$ (Abbildung 4-3 (B)) als auch TRPV4 (Abbildung 4-3 (C)) konnten ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert werden. Um eine Aussage über die Kolokalisation der einzelnen Kanäle mit Caveolin-1 in HMEC-1-Zellen treffen zu können, wurden die digitalen Einzelbilder der Proteine übereinander gelegt. Gelbe Signale weisen auf mögliche Kolokalisationen der Kanäle (rot) mit Caveolin-1 (grün) hin.

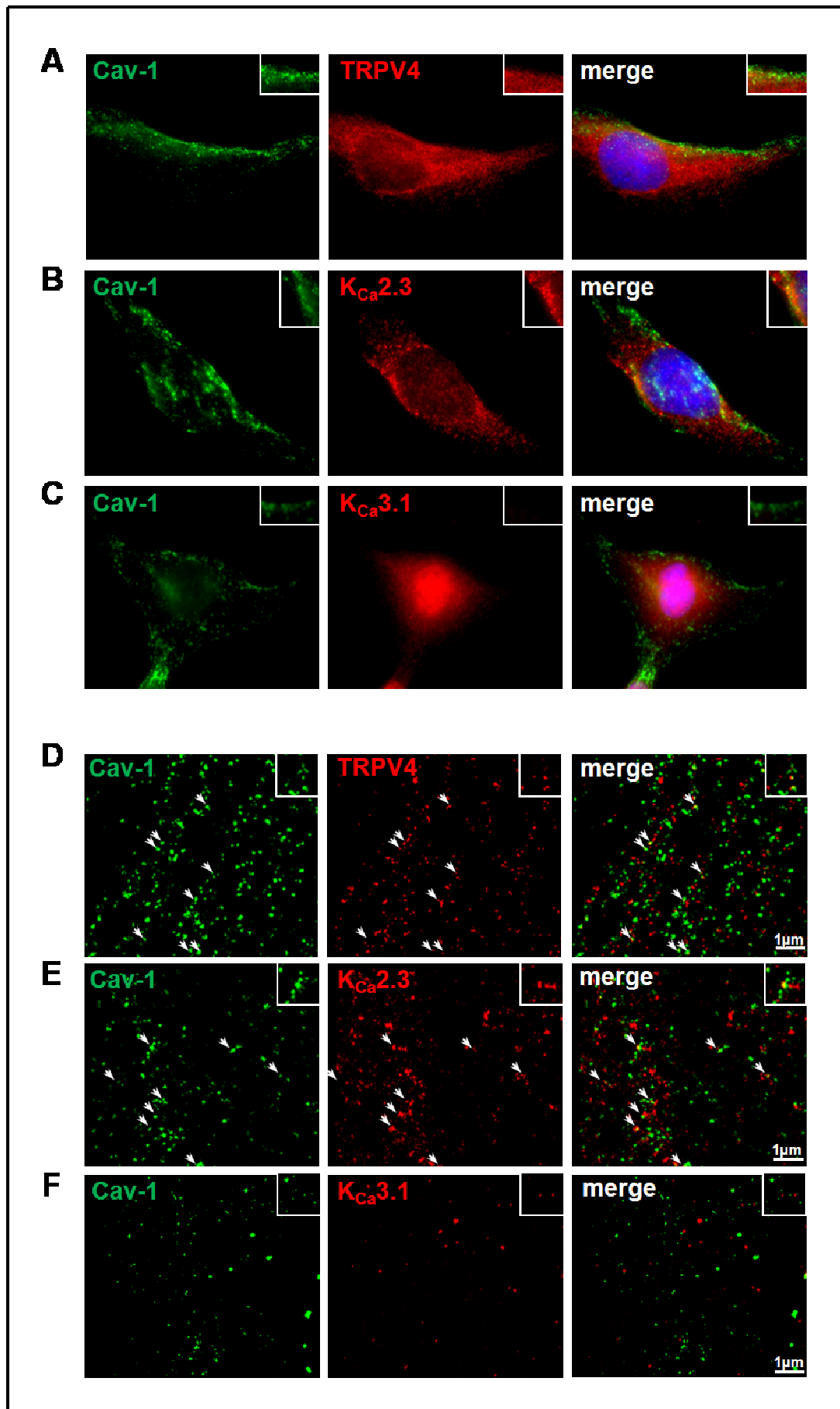


Abbildung 4-3: Caveolin-1 kolokalisiert mit TRPV4 und K_{Ca}2.3, aber nicht mit K_{Ca}3.1 in humanen Endothelzellen unter statischen Bedingungen.

(A) Auf Deckgläschen kultivierte HMEC-1 wurden fixiert und mit Anti-Caveolin-1 (grün) und Anti-TRPV4 (rot) immungefärbt. Eine Kolokalisation von Caveolin-1 und TRPV4 (gelb) konnte in der Zellmembran gezeigt werden. (B,C) Immunfärbungen gegen Caveolin-1 (grün) und gegen K_{Ca}2.3 bzw. K_{Ca}3.1 (rot) zeigen Kolokalisationen von Caveolin-1 mit K_{Ca}2.3, aber nicht mit K_{Ca}3.1 in humanen Endothelzellen unter statischen Bedingungen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. (D-E) Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops validieren die Kolokalisation (Pfeile) von Caveolin-1 mit TRPV4 und K_{Ca}2.3 detailgetreu. (F) Für Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 konnte auch in der hochauflösenden Mikroskopie keine Kolokalisation nachgewiesen werden.

Abbildung 4-3 (A) zeigt, dass TRPV4 und Caveolin-1 in HMEC-1 hauptsächlich in der Zellmembran nachweisbar waren. Eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder von TRPV4 und Caveolin-1 zeigte gelbe Signale in der Zellmembran, was auf eine partielle Kolokalisation des TRPV4 mit Caveolin-1 hinwies. In Abbildung 4-3 (B) ist zu sehen, dass Caveolin-1 und K_{Ca}2.3 eine ähnliche Verteilung in den HMEC-1-Zellen aufwiesen. K_{Ca}2.3 war wie Caveolin-1 vorwiegend in der Zellmembran der HMEC-1 nachweisbar und wurde nur teilweise im Zytosol lokalisiert. Die übereinander gelegten Fluoreszenzbilder von K_{Ca}2.3 und Caveolin-1 zeigten gelbe Signale in der Zellmembran, was auf eine partielle Kolokalisation des K_{Ca}2.3 mit Caveolin-1 hinwies. Im Gegensatz zu K_{Ca}2.3 besaßen Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 eine unterschiedliche Verteilung in den HMEC-1-Zellen. Wie in Abbildung 4-3 (C) zu sehen ist, zeigten die überlagerten Bilder der Fluoreszenz keine Kolokalisation von K_{Ca}3.1 und Caveolin-1 in der Zellmembran von HMEC-1 (gelb markierte Bereiche waren partiell um den Zellkern sichtbar). Die herkömmliche Immunfluoreszenzmikroskopie (Axio Observer Z.1 Mikroskop) liefert somit einen ersten Hinweis, dass Caveolin-1 mit TRPV4 und K_{Ca}2.3 jedoch nicht mit K_{Ca}3.1 unter statischen Bedingungen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen kolokalisieren.

Allerdings liegt die Auflösungsgrenze eines herkömmlichen Lichtmikroskops in xy-Richtung (lateral) typischerweise bei ca. 200 nm. Da die Größe der Caveolae bei etwa 50- 100 nm liegt, ist es schwer mit der herkömmlichen Immunfluoreszenzmikroskopie zwei benachbarte Punkte innerhalb der Caveolae als getrennte Objekte darzustellen. Hier bietet die neuartige Technik der GSDIM-Mikroskopie (*ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*) die Möglichkeit, dies zu überwinden. Das GSDIM-Verfahren ist eine hochauflösende Mikroskopietechnik, bei der Auflösungen von bis zu 20 nm erzielt werden können. Für die hochauflösende Darstellung der Komponenten wurden HMEC-1 auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert, anschließend fixiert und gegen Caveolin-1 und TRPV4, K_{Ca}2.3 oder Anti-K_{Ca}3.1 mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Anschließend wurde

Caveolin-1 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und TRPV4 bzw. die K_{Ca} -Kanäle mit Alexa Fluor 555-Antikörper markiert und mittels GSDIM-Mikroskopie (Leica SR GSD) untersucht. Die Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops validieren die Kolokalisation (Pfeile) von Caveolin-1 mit TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ detailgetreu. Für Caveolin-1 und $K_{Ca3.1}$ konnte mittels hochauflösender Mikroskopie keine Kolokalisation nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter statischen Bedingungen eine räumliche Assoziation zwischen Caveolin-1 und den $K_{Ca2.3}$ -Kanälen sowie zwischen Caveolin-1 und den TRPV4-Kanälen, jedoch nicht zwischen Caveolin-1 und den $K_{Ca3.1}$ -Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen besteht.

4.1.4 Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 mit $K_{Ca2.3}$ - und TRPV4-Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Nachdem mittels Immunfluoreszenzmikroskopie eine räumliche Assoziation von Caveolin-1 mit TRPV4 und $K_{Ca2.3}$, jedoch nicht mit $K_{Ca3.1}$ gezeigt wurde, erfolgte eine Überprüfung möglicher Protein-Protein-Interaktionen. Auf biochemischer Ebene lassen sich Protein-Protein-Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) nachweisen. Mit Hilfe eines Antikörpers kann ein Protein mitsamt seiner Interaktionspartner aus einem Zelllysate präzipitiert werden. Das präzipitierte Protein und sein Interaktionspartner können anschließend in einer Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Mit den Lysaten der HMEC-1 wurde eine Ko-IP durchgeführt. Dazu wurden die HMEC-1 zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet wurde mit einem Lysepuffer aufgeschlossen. Daraufhin wurde das Lysat mit dem Caveolin-1 Antikörper und anschließend mit Protein G *Dynabeads* inkubiert. Nach entsprechenden Waschschritten wurden die mit den Proteinen beladenen Protein G *Dynabeads* mittels eines Magneten pelletiert. Abschließend wurden sowohl der Überstand als auch die Protein G *Dynabeads* mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western Blot analysiert.

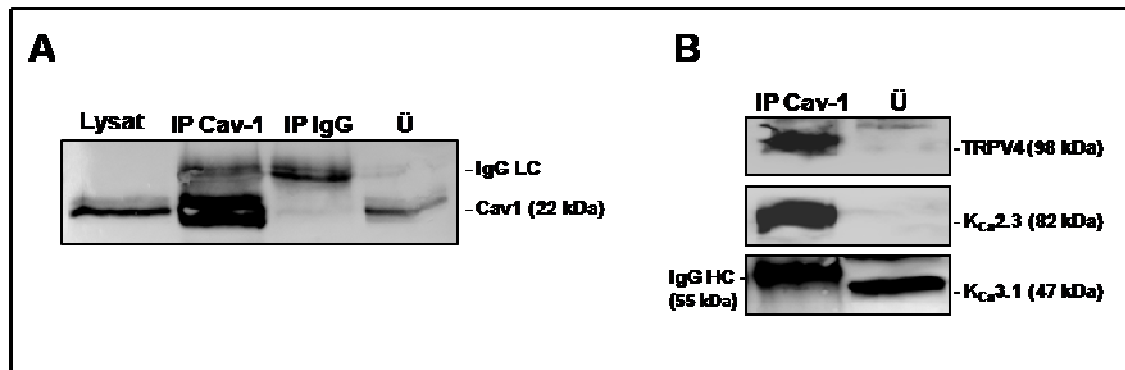


Abbildung 4-4: Protein-Protein-Interaktionen von Caveolin-1 mit TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen.

(A) Immunpräzipitation von Caveolin-1 mit Lysat aus HMEC-1 Zellen, (IP IgG)- Präzipitation mit Anti-IgG als Negativkontrolle, (Ü)- Überstand der Präzipitation. (B) Ko-IP Studie mit HMEC-1 Zelllysaten. Die Ko-Präzipitation erfolgte mit Hilfe eines Anti-Caveolin-1 Antikörpers und anschließender Western Blot Analyse. Repräsentative Immunblots zeigen, dass $K_{Ca}2.3$ und TRPV4, aber nicht $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1 interagierten.

Um zu prüfen, ob der Anti-Caveolin-1 Antikörper an das Protein G der *Dynabeads* gebunden hatte und somit eine Anreicherung des Caveolin-1 Proteins möglich war, wurde zuerst eine Immunfärbung gegen Caveolin-1 durchgeführt. Abbildung 4-4 (A) zeigt, dass für Caveolin-1 (22 kDa) eine deutliche Bande im IP- Ansatz detektiert wurde. Der Anti-Caveolin-1 Antikörper hatte an die Protein G *Dynabeads* gebunden und Caveolin-1 konnte mittels Immunpräzipitation angereichert werden. Im nächsten Schritt (Abbildung 4-4 (B)) wurde gezeigt, dass nach Präzipitation mit Anti-Caveolin-1 und anschließender Immunfärbung mit Anti-TRPV4 eine Bande für TRPV4 (98 kDa) im IP-Ansatz nachweisbar war. Bei den K_{Ca} -Kanälen wurde nur $K_{Ca}2.3$ (82 kDa) ko-präzipitiert. Für $K_{Ca}3.1$ (47 kDa) wurde keine Bande im IP-Ansatz detektiert. Hier war lediglich die schwere Kette des zur Präzipitation verwendeten Anti-Caveolin-1 Antikörpers bei 55 kDa zu sehen, da dieser im SDS-Gel ebenfalls aufgetrennt und anschließend in der Western Blot Analyse vom Sekundärantikörper unspezifisch detektiert wurde. $K_{Ca}3.1$ befand sich im Überstand der IP.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass eine Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 mit $K_{Ca}2.3$ und TRPV4, jedoch nicht mit $K_{Ca}3.1$, in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen besteht.

4.2 Untersuchung einer putativen Interaktion von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Eine geordnete Zusammenlagerung von Membranproteinen in distinkten Membrandomänen, wie den endothelialen Caveolae, erlaubt die räumliche und zeitliche Koordination unterschiedlicher Signaltransduktionswege. Unsere bisherigen Daten zeigen, dass sowohl $K_{Ca}2.3$ als auch TRPV4 in Caveolae humaner Endothelzellen angereichert sind. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Kanäle untereinander eine putative Interaktion ausüben. Diese Art der physischen Interaktion würde eine effizientere Signalübertragung zwischen zwei Molekülen erlauben. Aus diesem Grunde war es für uns interessant, zu prüfen, ob in Endothelzellen eine ähnliche physikalische Wechselwirkung zwischen dem mechanosensitiven TRPV4 und dem an der EDHF-Antwort beteiligten $K_{Ca}2.3$ -Kanal existiert. Es liegt nahe, dass der Ca^{2+} -Eintritt durch TRPV4 zur Aktivierung von benachbarten $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ führt. Eine solche Koaktivierung von Kaliumkanälen wurde bereits Anfang der 90er Jahre von Hoyer und Mitarbeitern gezeigt (Hoyer et al. 1992). Bisher ist die spezifische Interaktion einer TRP-Isoform (TRPV4, TRPA1, TRPV3 oder TRPC6) mit einem K_{Ca} -Kanal in Endothelzellen noch nicht vollständig geklärt. Jüngste Studien lassen einen Hinweis auf eine Interaktion des Ca^{2+} -permeabel TRPV4-Kanals und den K_{Ca} -Kanälen ($K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$) in Endothelzellen vermuten (Sonkusare et al. 2012; Earley et al. 2009; Zhang et al. 2009; Köhler et al. 2006). Studien von Kwan et al. zeigten, dass in glatten Gefäßmuskulaturzellen TRPC1 physisch mit einem anderen K_{Ca} -Kanal, dem $K_{Ca}1.1$ (BK_{Ca}) assoziiert ist (Kwan et al. 2009). Erste Hinweise hierfür wurden von Ma et al. in Endothelzellen der Ratte beschrieben (Ma et al. 2013). Auf dieser Annahme aufbauend, wurden Immunfluoreszenzstudien zur Bestimmung der räumlichen Assoziation und eine Ko-Immunpräzipitation zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion mit HMEC-1 durchgeführt.

4.2.1 Räumliche Assoziation von TRPV4- und $K_{Ca}2.3$ -Kanälen

Für die herkömmliche Immunfluoreszenzmikroskopie (Axio Observer Z.1 Mikroskop) wurden HMEC-1 auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern kultiviert und anschließend fixiert. Es folgte eine Immunfärbung gegen TRPV4 und $K_{Ca}2.3$. Anschließend wurde TRPV4 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und $K_{Ca}2.3$ mittels Alexa Fluor 555-Antikörper markiert.

In Abbildung 4-5 (A) ist zu sehen, dass sowohl TRPV4 wie auch $K_{Ca}2.3$ in HMEC-1 zum größten Teil in der Zellmembran nachweisbar waren. Eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder von TRPV4 und Caveolin-1 zeigte gelbe Signale in der Zellmembran, was auf eine partielle Kolokalisation des TRPV4 mit $K_{Ca}2.3$ hinwies. Die Immunfluoreszenzbilder mit dem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop lieferten erste Hinweise auf eine Kolokalisation zwischen $K_{Ca}2.3$ und TRPV4.

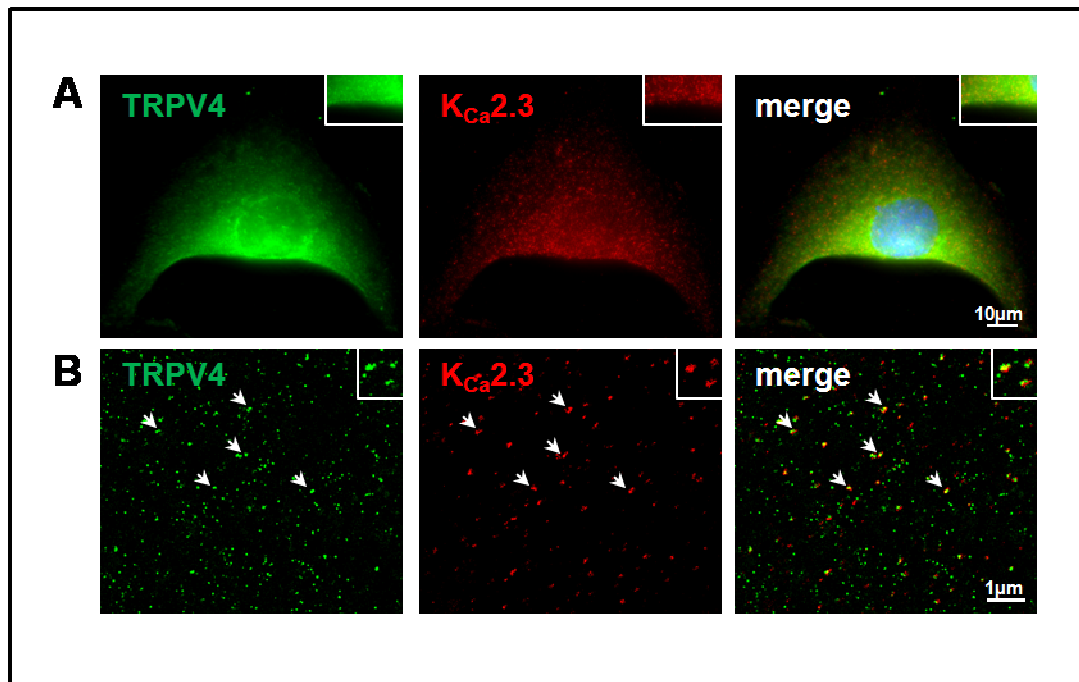


Abbildung 4-5: Räumliche Assoziation von TRPV4- und $K_{Ca}2.3$ - Kanälen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen.

(A+B) Auf Deckgläsern kultivierte HMEC-1 wurden fixiert und mit anti-TRPV4-AlexaFluor488 (grün) und anti- $K_{Ca}2.3$ -AlexaFluor555 (rot) immungefärbt. **(A)** Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt die räumliche Assoziation der beiden Proteine in der Zellmembran. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) markiert. **(B)** Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops validieren die Kolokalisation (Pfeile) von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ detailgetreu.

Abbildung 4-5 (A) zeigt, dass es durch die Auflösungsgrenze des herkömmlichen Lichtmikroskops (in xy-Richtung (lateral) bei ca. 200 nm) kaum Möglich ist, zwei benachbarte Punkte innerhalb der Caveolae als getrennte Objekte darzustellen. Daher haben wir uns entschieden die hochauflösende GSDIM-Mikroskopie, die eine Auflösung von bis zu 20 nm erzielt, zu verwenden.

Für die hochauflösende Darstellung der Komponenten wurden HMEC-1 auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert, anschließend fixiert und eine Immunfärbung gegen TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ durchgeführt. Anschließend wurde TRPV4 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und $K_{Ca}2.3$ mittels Alexa Fluor 555-Antikörper markiert und mit

Hilfe der GSDIM-Mikroskopie (Leica SR GSD) untersucht. Eine Überlagerung der hochauflösenden GSDIM-Bilder zeigte (Abbildung 4-5 (B)), dass es zu einer Kolokalisation von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ kommt (Pfeile). Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops validieren die Kolokalisation (Pfeile) von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ detailgetreu.

Die Daten liefern einen ersten Hinweis, dass unter statischen Bedingungen eine räumliche Assoziation zwischen TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen besteht.

4.2.2 Protein-Protein-Interaktion von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4

Nachdem eine räumliche Assoziation von $K_{Ca}2.3$ -TRPV4 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Überprüfung einer möglichen Protein-Protein-Interaktion von TRPV4 mit $K_{Ca}2.3$.

Hierzu wurde eine Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) mit dem Lysat der HMEC-1 durchgeführt. Die konfluent gewachsenen HMEC-1 wurden von der Petrischale abgeschabt, zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet wurde mit einem Lysepuffer aufgeschlossen. Daraufhin wurde das Lysat entweder mit einem Anti- $K_{Ca}2.3$ oder einem Anti-TRPV4 Antikörper und anschließend mit Protein G *Dynabeads* inkubiert. Nach entsprechenden Waschschritten wurde die mit den Proteinen beladenen Protein G *Dynabeads* mittels eines Magneten pelletiert. Abschließend wurden sowohl der Überstand als auch die Protein G *Dynabeads* mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western Blot analysiert.

Um zu prüfen, ob die Antikörper an das Protein G der Dynabeads gebunden hatte und somit eine Anreicherung des $K_{Ca}2.3$ - bzw. TRPV4-Proteins möglich war, wurde zuerst eine Anti- $K_{Ca}2.3$ bzw. Anti-TRPV4 Färbung durchgeführt. Abbildung 4-6 (A) zeigt, dass sowohl $K_{Ca}2.3$ (82 kDa) als auch TRPV4 (98 kDa) mittels Immunpräzipitation angereichert werden konnten.

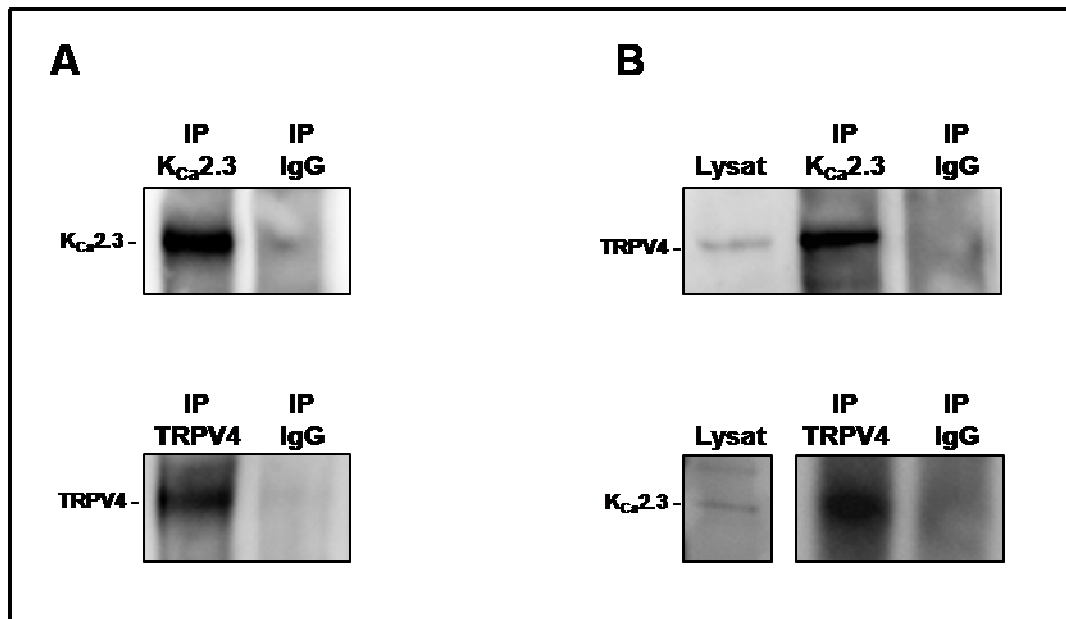


Abbildung 4-6: Protein-Protein-Interaktionen von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4.

(A) Immunpräzipitation von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4 mit Lysat aus HMEC-1 Zellen, (IP IgG)- Präzipitation mit Anti-IgG als Negativkontrolle. (B) Ko-IP Studie mit HMEC-1 Zelllysaten. Ko-Präzipitation mit Hilfe eines anti- $K_{Ca}2.3$ Antikörpers und anschließender Immunfärbung mit Anti-TRPV4 zeigt eine Interaktion der beiden Proteine. Die Ko-Präzipitation mit Hilfe eines Anti-TRPV4 Antikörpers und anschließender Immunfärbung mit Anti- $K_{Ca}2.3$ dient der Validierung.

Im nächsten Schritt (Abbildung 4-6 (B)) konnte gezeigt werden, dass nach Präzipitation mit Anti- $K_{Ca}2.3$ und anschließender Immunfärbung gegen TRPV4 eine Bande für TRPV4 (98 kDa) im IP-Ansatz nachweisbar war. Anschließend wurde zur Kontrolle mit einem Anti-TRPV4 Antikörper präzipitiert und mittels Western Blot kontrolliert, ob $K_{Ca}2.3$ kopräzipitierte. Auch hier wurde eine deutliche Bande für $K_{Ca}2.3$ (98 kDa) detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der vorher gezeigten Kolo-kalisation um eine stabile Protein-Protein-Interaktion zwischen $K_{Ca}2.3$ und TRPV4 handelt.

4.2.3 Relevanz der caveolären Struktur für die Protein-Protein-Interaktion von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob der Verlust der caveolären Struktur einen Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktion von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ hat. Zur Untersuchung wurden HMEC-1-Zellen für 1 h mit 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin inkubiert. Methyl- β -Cyclodextrin zerstört die Struktur der Caveolae, indem es der Zellmembran Cholesterol entzieht.

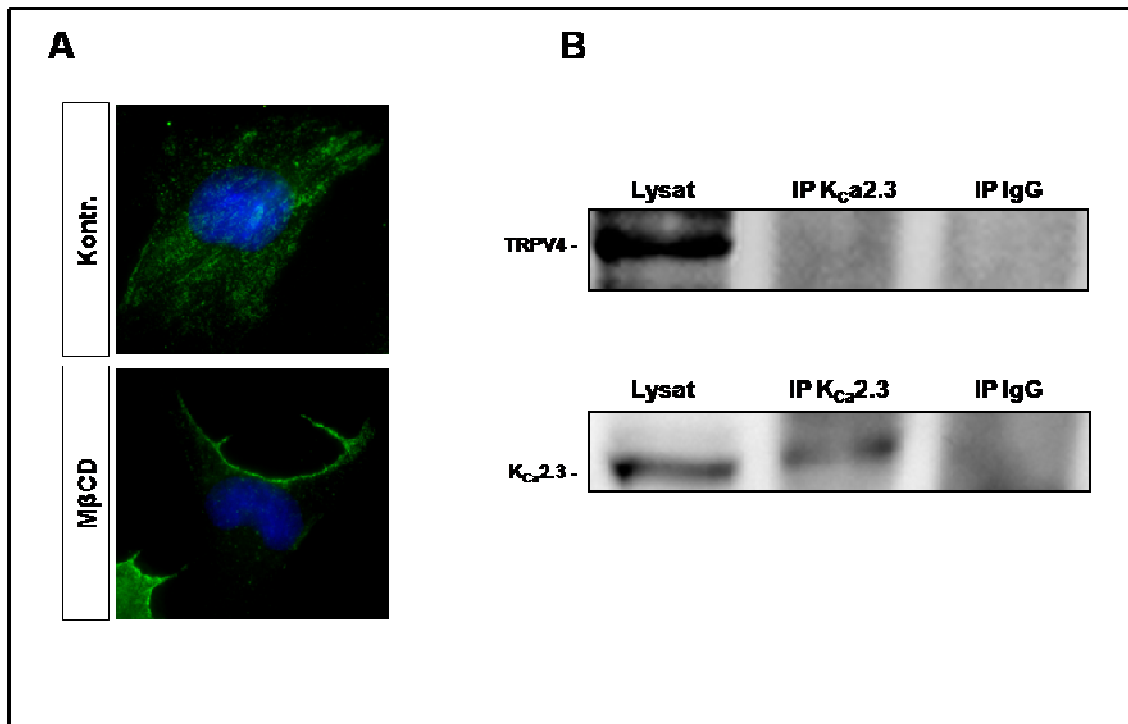


Abbildung 4-7: Dissoziation der räumlichen Struktur der Caveolae durch Methyl-β-Cyclodextrin führt zum Verlust der Protein-Interaktion von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4.

(A) HMEC-1 Zellen vor und nach Inkubation mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 mM, 40 min.). Immunfärbung erfolgte mit Anti-Caveolin-1 (grün), Zellkerne wurden mit Dapi blau gefärbt. (B) Ko-IP Studie mit HMEC-1 Zellysate nach Behandlung der Zellen mit 10 nM Methyl-β-Cyclodextrin für 40 min. Repräsentativer Immunblot nach Ko-Präzipitation mit Anti- $K_{Ca}2.3$ und Anti-TRPV4-Immunfärbung zeigt, dass die Zerstörung der Caveolae zum Verlust der Interaktion von TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ führt.

Um sicherzustellen, dass die 40-minütige Inkubation mit 10 nM Methyl-β-Cyclodextrin lediglich zu einer Umverteilung und nicht zu einem Verlust des Caveolin-1 führt, wurde Caveolin-1 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper markiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation der Proteine in den behandelten und unbehandelten HMEC-1 anschließend verglichen.

In Abbildung 4-7 (A) sind HMEC-1 vor und nach 40-minütiger Behandlung mit 10 mM Methyl-β-Cyclodextrin zu sehen. Auch nach Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin war Caveolin-1 weiterhin in der Zelle vorhanden. Zur Überprüfung, ob es durch das Fehlen der räumlichen Struktur der Caveolae zu einer Änderung der Protein-Protein-Interaktion zwischen TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ kommt, wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Dafür wurde mit einem Anti- $K_{Ca}2.3$ Antikörper präzipitiert und anschließend im Western Blot kontrolliert, ob TRPV4 kopräzipitierte. Um auszuschließen, dass TRPV4 aufgrund einer unspezifischen Bindung mit den *Dynabeads* nachgewiesen wurde, wurde zur Kontrolle jeweils ein Ansatz mit Kaninchen IgG-Antikörper mitgeführt. In Abbildung 4-7 (B) ist gezeigt, dass $K_{Ca}2.3$ nach der Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin im Gesamtlysate weiterhin

nachweisbar ist. Nach einer Immunpräzipitation mit Anti-TRPV4 und anschließender Färbung gegen K_{Ca}2.3, konnte K_{Ca}2.3 jedoch nicht mehr detektiert werden. Um zu kontrollieren, ob die Präzipitation von K_{Ca}2.3 erfolgreich war, wurde eine Gegenfärbung mit einem Anti-K_{Ca}2.3 Antikörper durchgeführt. Im IP-Ansatz war eine deutliche Bande für K_{Ca}2.3 detektierbar. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigen, dass die Zerstörung der caveolären Struktur durch einen Cholesterolentzug zu einem Verlust der Protein-Protein-Interaktion von TRPV4 und K_{Ca}2.3 führt.

4.3 Einfluss von hämodynamischen Kräften auf die räumliche Assoziation von K_{Ca}3.1 zu Caveolin-1 und TRPV4

In vivo sind Endothelzellen einer ständigen biomechanischen Stimulation ausgesetzt. Der Blutfluss innerhalb der Gefäße erzeugt ein komplexes Zusammenspiel von mindestens drei verschiedenen mechanischen Kräften - der endothelialen Schubspannung, der zirkulären Wandschubspannung sowie dem hydrostatischen Druck p (Kurz & Sandau 1997). Die Wandschubspannung (*shear stress*), welche vom strömenden Blut auf die Endothelschicht der Gefäße ausgeübt wird, ist eine wichtige hämodynamische Kraft und natürlicher physiologischer Stimulus, der eine Adaption der Gefäßweite auslöst und damit zur adäquaten Einstellung der Organperfusion beiträgt. Eine Erhöhung der Wandschubspannung erzeugt eine endothelabhängige Vasodilatation. Es ist bekannt, dass hier Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen (Hartmannsgruber et al. 2007).

Um die Endothelzellen unter möglichst *in vivo*-nahen Bedingungen kultivieren zu können, wurde ein *in vitro* System benötigt, mit dem die Zellen über einen längeren Zeitraum (24 h) kontrollierten Flussbedingungen ausgesetzt werden können. Die Kegel-Platten-Scherungsapparatur ist das einfachste Modell und bietet den Vorteil, eine große Anzahl an Zellen pro Ansatz zu verwenden und wurde für die biochemische Auswertung verwendet. Hierzu wurden die Zellen mittels des sogenannten Kegel-Platten-Viskometers in 100 mm große, mit Gelatine beschichtete Petrischalen für 24 h unter 15 dyn/cm² Schubspannung gesetzt. Als Kontrolle dienten HMEC-1, die stationär kultiviert wurden. In mehreren Versuchen und in Anlehnung an die Vorgaben des Herstellers wurde zunächst eine optimale Feineinstellung des Kegels ermittelt. Ein zu hoher Anpressdruck führte zur Zellabscherung, bei zu großem Abstand des Kegels zur

Zelloberfläche trat die typische Zellausrichtung als Marker der wirkenden laminaren Schubspannung nicht in Erscheinung.

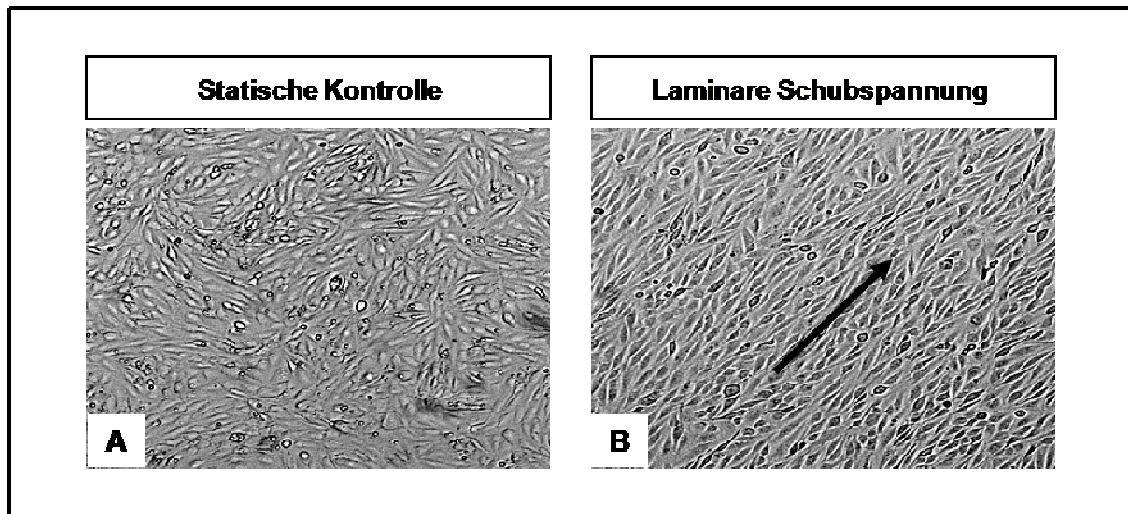


Abbildung 4-8: Ausrichtung von HMEC-1 unter 15 dyn/cm².

(A) Als Kontrolle wurden HMEC-1 24 h unter statischen Bedingungen kultiviert. (B) Ausrichtung der HMEC-1 unter laminarer Schubspannung (15 dyn/cm² für 24 h). Strömungsrichtung von links unten nach rechts oben.

Die Zellausrichtung ist der einfachste Indikator der Wirksamkeit einer laminaren Schubspannung und gibt schon *in vivo* Auskunft über ihre Qualität und Quantität (Nerem et al. 1981). Daten zur Zellausrichtung aus *in vitro* Experimenten sind zahlreich publiziert (Coan et al. 1993; Levesque & Nerem 1985; Dewey et al. 1981) und ließen sich mit HMEC-1 reproduzieren: Abbildung 4-8 zeigt eine starke zelluläre Ausrichtung der HMEC-1 in Strömungsrichtung unter 15 dyn/cm² für 24 Stunden.

4.3.1 Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst Interaktion von K_{Ca}3.1 und Caveolin-1

Nach der Stimulation der Zellen mit laminarer Schubspannung (15 dyn/cm² für 24 Stunden) wurde eine Proteinisolation (wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben) durchgeführt. Zum Vergleich wurden Proben stationär gehaltener HMEC-1 mitgeführt. Die Lysate wurden für die Ko-IP verwendet. Dafür wurden diese erst mit Anti-Caveolin-1 Antikörper und anschließend mit Protein G *Dynabeads* inkubiert. Nach entsprechenden Waschschritten wurden die mit den Proteinen beladenen Protein G *Dynabeads* mittels Magneten pelletiert und sowohl der Überstand als auch die Protein G *Dynabeads*

wurden abschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western Blot analysiert.

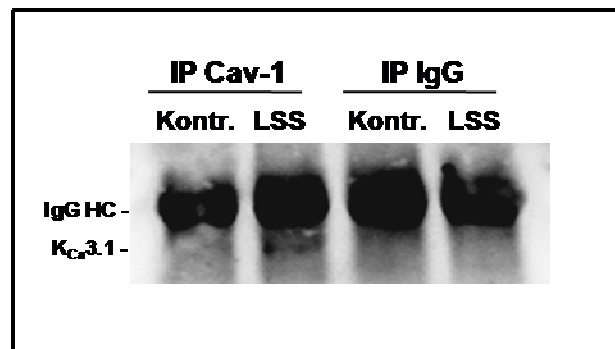


Abbildung 4-9: Applikation von Schubspannung führt zur Interaktion von Caveolin-1 und KCa3.1.

Ko-IP Studie mit Zelllysaten stationär und unter laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2) kultivierter HMEC-1. Ko-Präzipitation mit Hilfe eines Anti-Caveolin-1 Antikörpers und anschließender Immunfärbung mit Anti-KCa3.1 zeigte eine *de novo* Interaktion der beiden Proteine unter laminarer Schubspannung.

Ein Nachteil der Immunpräzipitation besteht darin, dass die zur Präzipitation verwendeten Antikörper im SDS-Gel ebenfalls aufgetrennt und anschließend in der Western Blot Analyse von dem Sekundärantikörper unspezifisch detektiert werden. Ein Problem ergab sich in dieser Arbeit, da die Größe der schweren Kette (55 kDa) ähnlich der Größe des gesuchten KCa3.1-Proteins (45 kDa) ist. Zur Optimierung der Immunpräzipitation wurde die Menge des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers reduziert und der herkömmliche Sekundärantikörper wurde gegen einen Antikörper ausgetauscht, der nur die leichte Kette erkennen sollte. Leider kam es weiterhin zu unspezifischen Detektion der schweren Kette, wodurch weiterhin eine Bande bei 55 kDa detektiert wurde.

Abbildung 4-9 zeigt, dass nach Präzipitation mit Anti-Caveolin-1 Antikörper und anschließender Immunfärbung gegen KCa3.1 im IP-Ansatz nach Schubspannung eine leichte Bande unterhalb der schweren Kette (55 kDa) für KCa3.1 bei 47 kDa nachweisbar war. Um auszuschließen, dass KCa3.1 aufgrund einer unspezifischen Bindung mit den *Dynabeads* nachgewiesen wurde, wurde zur Kontrolle jeweils ein Ansatz mit Maus IgG-Antikörper mitgeführt. Hier war ebenfalls nur die schwere Kette (55 kDa) des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers nachweisbar. Im IP-Ansatz der stationären Kontrolle konnte KCa3.1 nicht kopräzipitiert werden. Die Applikation laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2 für 24 h) führte zu einer neuen Protein-Protein-Interaktion zwischen Caveolin-1 und KCa3.1.

4.3.2 Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst die räumliche Assoziation von K_{Ca}3.1 und Caveolin-1

Für die mikroskopische Auswertung wurde das Flusskammern-Pumpsystem zur Applikation laminarer Schubspannung verwendet. Das Modell besteht aus Objektträgern mit einem Kanal (μ -Kanal), in dem die Zellen ausgesät und anschließend für 24 Stunden unter 15 dyn/cm^2 laminarer Schubspannung gesetzt wurden. Der Boden der Objektträger diente als Deckglas und ermöglichte somit direkt nach Stimulation eine Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung und mikroskopischen Auswertung der Zellen. Bereits 6 - 8 Stunden nach Aussaat der HMEC-1 waren die Zellen ausreichend angehaftet, um die Schubspannung anzulegen. Nachdem die Zellen anschließend für 24 Stunden unter laminaren Flussbedingungen von 15 dyn/cm^2 weiter kultiviert wurden, folgte die Immunfluoreszenzfärbung. Für jeden Ansatz wurde eine statische Kontrolle mitgeführt.

Die Zellen wurden zuerst fixiert und anschließend wurde Caveolin-1 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und K_{Ca}3.1 mit einem Alexa Fluor 555-Antikörper markiert. Aufgrund der Auflösungsgrenze nach Abbe bei herkömmlichen Lichtmikroskopen haben wir uns auch hier dazu entschieden, das GSDIM-Verfahren zu verwenden (Abel et al. 1873). Dazu wurden die Flusskammern nach der Immunfärbung mit GSDIM-Medium (PBS mit 10 % (W/V) Glucose, 0,5 mg/ml Glucose-Oxidase, 40 $\mu\text{g/ml}$ Katalase; pH 7.4) befüllt und mikroskopisch ausgewertet. Als Kontrolle wurde der fluoreszierende Zweitantikörper alleine auf die HMEC-1-Zellen gegeben. Hier zeigte sich wie erwartet kein Signal.

Abbildung 4-10 zeigt repräsentative Beispiele der beobachteten räumlichen Assoziation von Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen mit und ohne Stimulation laminarer Schubspannung. Eine Überlagerung der hochauflösenden GSDIM-Bilder zeigte bei den unter statischen Bedingungen kultivierten HMEC-1 (Abbildung 4-11 (A)) keine Kollokalisierungen von Caveolin-1 und K_{Ca}3.1. Die Überlagerung der GSDIM-Bilder der mit laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2 , 24 h) stimulierten HMEC-1 (Abbildung 4-11 (B)) zeigte partielle Kollokalisierung zwischen Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 (Pfeile).

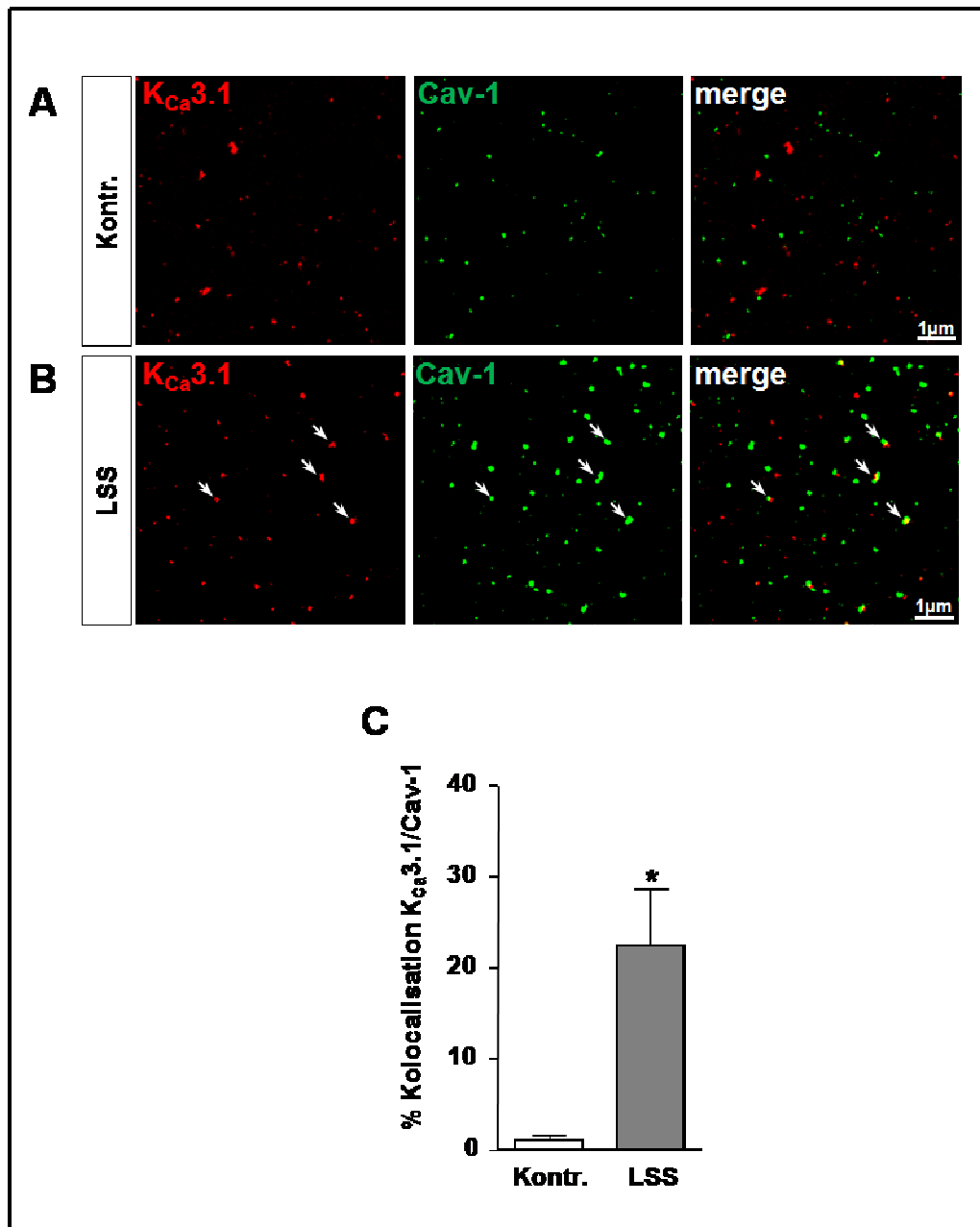


Abbildung 4-10: De novo Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1.

(A+B) In μ -Slides unter statischen (A) und gestressten (B) Bedingungen kultivierte HMEC-1 wurden fixiert und mit Anti-Caveolin-1-AlexaFluor488 (grün) und Anti- $K_{Ca}3.1$ -AlexaFluor555 (rot) immungefärbt. Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops validieren die Kolokalisation (Pfeile) von Caveolin-1 und $K_{Ca}3.1$ nach Applikation der laminaren Schubspannung (15 dyn/cm² für 24h) detailgetreu. (C) Quantifizierung von $K_{Ca}3.1$ /Caveolin-1 Kolokalisation in der Membran von humanen Endothelzellen unter statischen Bedingungen (Kontr.) und unter Applikation von laminarer Schubspannung (LSS). Die räumliche Assoziation ist in % der Kolokalisation von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1 angegeben (1,2 ± 0,5 % für stationär vs. 22,4 ± 0,5 % gestresst). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler angeben. n=6 für jeden Datenpunkt; * P<0,05.

Die statistische Auswertung (Abbildung 4-10 (C)) belegte, dass nach der Stimulation mit laminarer Schubspannung im Verhältnis zu der stationären Kontrolle etwa 20 % der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle mit Caveolin-1 räumlich assoziiert waren. Zusammenfassend konnte

gezeigt werden, dass die Stimulation mit laminarer Schubspannung einen Einfluss auf die räumliche Lokalisation zwischen Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 hatte.

4.3.3 Applikation laminarer Schubspannung hat keinen Einfluss auf die räumliche Assoziation von K_{Ca}3.1 und Clathrin

Um zu prüfen, ob es sich bei der Kolo­kalisation zwischen Caveolin-1 und K_{Ca}3.1 um einen spezifischen Prozess und nicht um eine zufällige Verschiebung in caveolären Membranstrukturen handelt, wurde als Kontrolle eine Immunfärbung gegen Clathrin und K_{Ca}3.1 unter statischen und mit Schubspannung stimulierten Bedingungen durchgeführt. Clathrin ist ein Protein, das ähnlich wie Caveolin-1 an der Einstülpung von Zellmembranen und der Bildung von Vesikeln beteiligt ist.

Nachdem die Zellen für 24 Stunden unter laminaren Flussbedingungen von 15 dyn/cm² kultiviert wurden, folgte eine Immunfluoreszenzfärbung. Für jeden Ansatz wurde eine statische Kontrolle mitgeführt. Nach der Fixierung der Zellen folgte eine Markierung von Clathrin mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und K_{Ca}3.1 mittels Alexa Fluor 555-Antikörper. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der GSDIM-Mikroskopie (Leica SR GSD).

Abbildung 4-11 zeigt repräsentative Beispiele der beobachteten Lokalisation von Clathrin und K_{Ca}3.1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Eine Überlagerung der hochauflösenden GSDIM-Bilder zeigte unter statischen (Abbildung 4-11 (A)) Bedingungen und nach Applikation laminarer Schubspannung (Abbildung 4-11 (B)) keine Kolo­kalisationen von Clathrin und K_{Ca}3.1. Die statistische Auswertung (Abbildung 4-11 (C)) zeigte, dass in humanen mikrovaskulären Endothelzellen die Stimulation mit laminarer Schubspannung keinen Einfluss auf die räumliche Lokalisation zwischen Clathrin und K_{Ca}3.1 hatte.

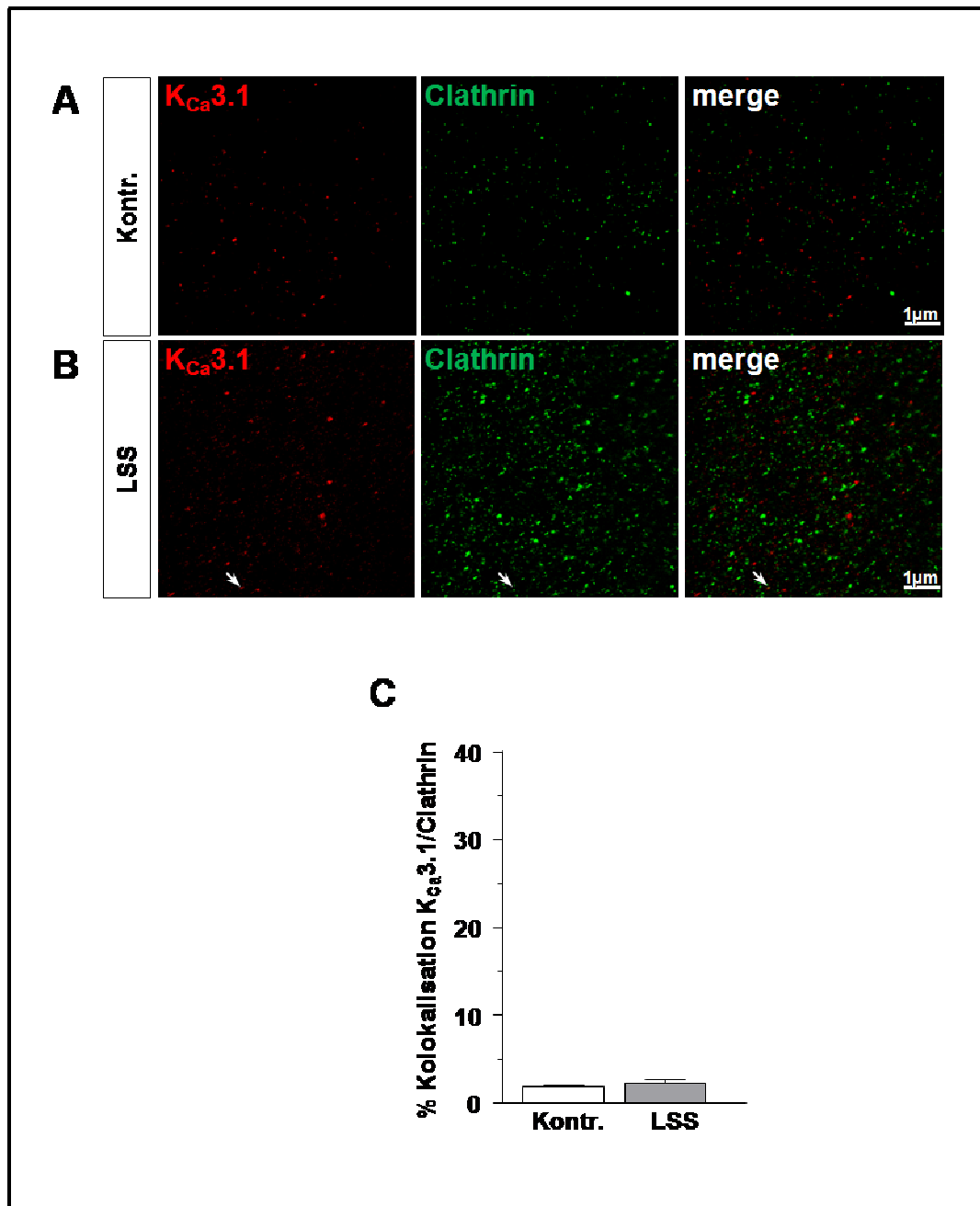


Abbildung 4-11: Applikation laminarer Schubspannung hat keinen Einfluss auf die Assoziation von K_{Ca}3.1 mit Clathrin in HMEC-1.

(A+B) In μ -Slides unter statischen **(A)** und gestressten **(B)** Bedingungen kultivierte HMEC-1 wurden fixiert und mit Anti-Clathrin-AlexaFluor488 (grün) und Anti-K_{Ca}3.1-AlexaFluor555 (rot) immungefärbt. Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops zeigen keine Kolokalisation von Clathrin und K_{Ca}3.1 nach Applikation der laminaren Schubspannung (15 dyn/cm² für 24 h). **(C)** Quantifizierung der K_{Ca}3.1/Clathrin Kolokalisation in der Membran von humanen Endothelzellen unter statischen Bedingungen (Kontr.) und unter Applikation von laminarer Schubspannung (LSS). Die räumliche Assoziation ist in % der Kolokalisation von K_{Ca}3.1 mit Clathrin angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angeben. n=4 für jeden Datenpunkt.

4.3.4 Applikation laminarer Schubspannung beeinflusst die räumliche Assoziation von K_{Ca}3.1 und TRPV4

Unsere bisherigen Daten zeigen, dass in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen eine räumliche Assoziation und Protein-Protein-Interaktion zwischen TRPV4 und K_{Ca}2.3 besteht. Zudem beeinflusste die Applikation laminarer Schubspannung die Lokalisation des K_{Ca}3.1 und führte zu einer *de novo* Protein-Protein-Interaktion von K_{Ca}3.1 und Caveolin-1. Es ist bekannt, dass K_{Ca}2.3 eine etwa 50 %-ige genetische Homologie zu K_{Ca}3.1 zeigt und dessen Aufbau weitestgehend entspricht. Im Endothel sind die beiden K_{Ca}-Kanäle, K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3, für die endothelabhängige Vasoregulation von großer Bedeutung. Bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation spielen sie eine wichtige Rolle, da beide Kanäle durch ihre K⁺-Leitfähigkeit für die initiale Hyperpolarisation der Endothelzelle mit darauf folgender Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich sind (Grgic et al. 2009). Es stellte sich die Frage, ob die Applikation laminarer Schubspannung auch einen Einfluss auf räumliche Assoziation von K_{Ca}3.1 und TRPV4 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen hat. Um zu dies zu prüfen, wurde eine Immunfärbung gegen K_{Ca}3.1 und TRPV4 unter statischen und mit Schubspannung stimulierten Bedingungen durchgeführt.

Nachdem HMEC-1 für 24 Stunden unter laminaren Flussbedingungen von 15 dyn/cm² kultiviert wurden, folgte eine Immunfluoreszenzfärbung. Für jeden Ansatz wurde eine statische Kontrolle mitgeführt. Nach der Fixierung der Zellen folgte eine Markierung von TRPV4 mittels Alexa Fluor 488-Antikörper und K_{Ca}3.1 mittels Alexa Fluor 555-Antikörper. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der GSDIM-Mikroskopie (Leica SR GSD).

Abbildung 4-12 zeigt repräsentative Beispiele der beobachteten Lokalisation von TRPV4 und K_{Ca}3.1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit laminarer Schubspannung (15 dyn/cm², 24 h) partiell zu einer räumlichen Assoziation von TRPV4 und K_{Ca}3.1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen führte (Abbildung 4-12(B)).

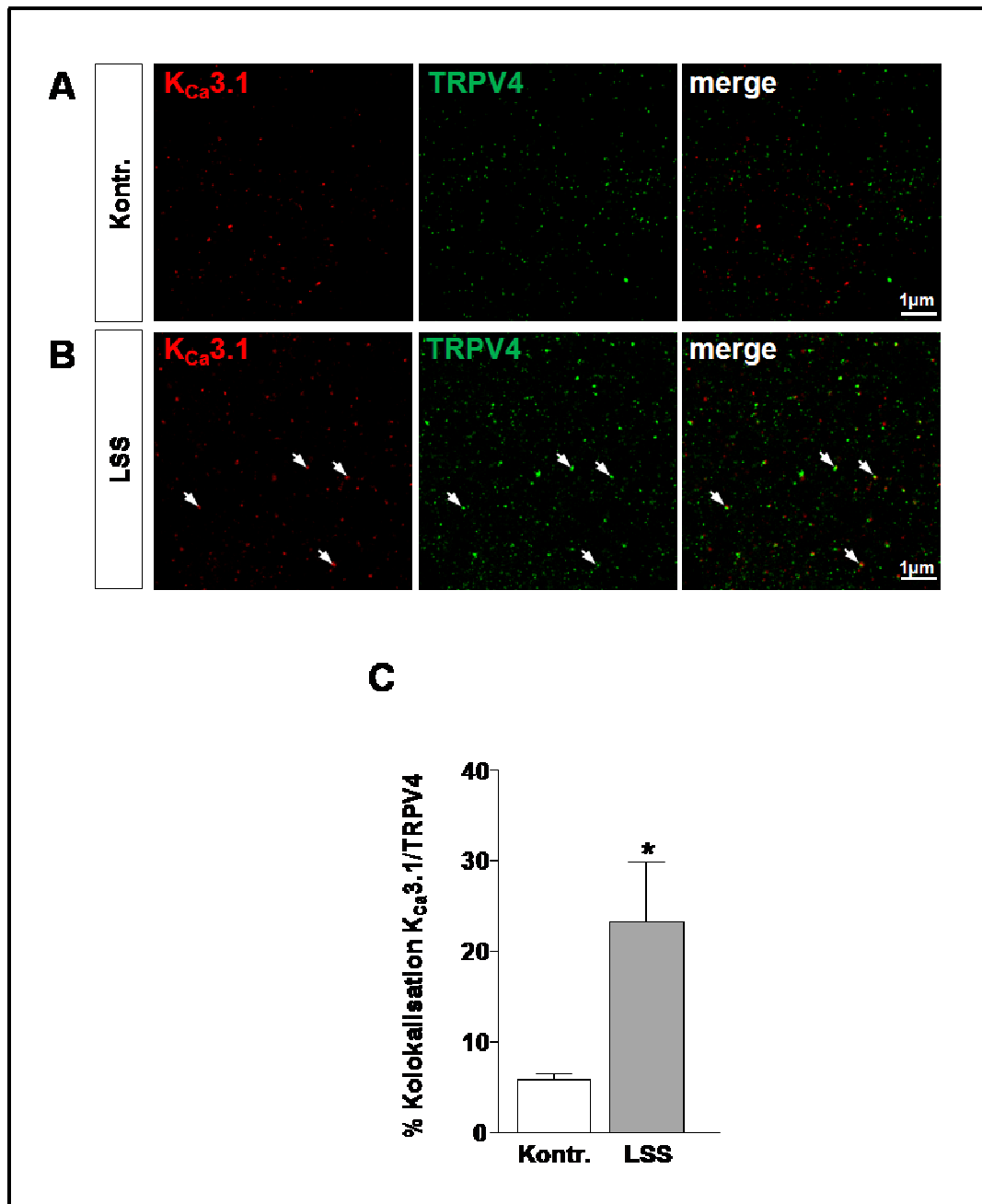


Abbildung 4-12: Applikation laminarer Schubspannung führt zu *de novo* Assoziation von K_{Ca}3.1 mit TRPV4 in HMEC-1.

(A+B) In μ -Slides unter statischen (A) und gestressten (B) Bedingungen kultivierte HMEC-1 wurden fixiert und mit Anti-TRPV4-AlexaFluor488 (grün) und Anti-K_{Ca}3.1-AlexaFluor555 (rot) immungefärbt. Untersuchungen mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops zeigen die Kolokalisation (Pfeile) von TRPV4 und K_{Ca}3.1 nach Applikation der laminaren Schubspannung (15 dyn/cm² für 24 h) detailgetreu. (C) Quantifizierung der K_{Ca}3.1/TRPV4 Kolokalisation in der Membran humaner Endothelzellen unter statischen Bedingungen (Kontr.) und unter Applikation von laminarer Schubspannung (LSS). Die räumliche Assoziation ist in % der Kolokalisation von K_{Ca}3.1 mit TRPV4 (5,9 ± 0,7 % für stationär vs. 23,3 ± 6,6 % gestresst). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. n=4 für jeden Datenpunkt; * P<0,05.

Die statistische Auswertung (Abbildung 4-12 (C)) zeigte, dass nach Applikation der laminaren Schubspannung die Koloalisation von K_{Ca}3.1 mit TRPV4 von etwa 7 % unter statischen Bedingungen auf etwa 20 % unter gestressten Bedingungen gestiegen war. Die Resultate zeigen, dass eine 24 stündige Stimulation der HMEC-1 mit laminarer Schubspannung von 15 dyn/cm² zu einer partiellen *de novo* Assoziation von K_{Ca}3.1 mit Caveolin-1 und TRPV4 führte.

4.4 Relevanz von Caveolin-1 für die K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3-Funktionen

In den ersten beiden Ergebnisteilen konnte anhand von *in vitro* Studien an humanen mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden, dass unter statischen Bedingungen K_{Ca}2.3 und nach Applikation laminarer Schubspannung partiell K_{Ca}3.1 mit Caveolin-1 koloalisieren und eine Protein-Protein-Interaktion ausbilden. Daher sollte im nächsten Schritt anhand von *in vivo* Studien geprüft werden, ob ein Fehlen des Caveolin-1-Proteins und somit der caveolären Struktur, einen Einfluss auf die Ströme der K_{Ca}-Kanäle hat. Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode zur Beobachtung und Analyse von Ionenkanalströmen in Zellen und Membranen. Die hohe zeitliche Auflösung dieser Methode, ihre Genauigkeit sowie die hohe Geschwindigkeit der Signalübertragung machen Strommessung auf Einzelkanalebene möglich. Die im Jahr 1976 publizierte Methode wurde von Neher und Sakmann entwickelt und stellt heute die Basis für zahlreiche Methoden der modernen Elektrophysiologie dar.

Die Genotypisierung der Tiere für das Caveolin-1-Gen wurde nach dem Handbuch von Jackson Laboratory mit den Primern Wildtyp *forward*, Mutante *forward* und Mutante *reverse* (Sequenz siehe Tabelle 3-10) ausgeführt. Bei dem *Knockout*-Gen wurden Exon1, Exon2 und ein Teil der Promotor Region (insgesamt 2.2 kb große Region) durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Somit ergab die Multiplex-PCR ein Produkt von 690 bp bei den Wildtyp-Tieren und ein Produkt von 410 bp bei Caveolin-1-*Knockout*-Tieren. Abbildung 4-13 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Genotypisierung des Wildtyp und der Caveolin-1-*Knockout*-Maus.

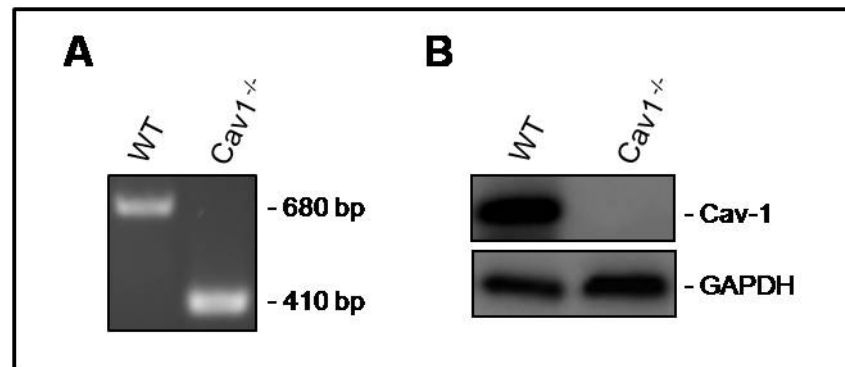


Abbildung 4-13: Überprüfung des Genotyps mittels PCR und Western Blot Analyse.

(A) Aus Schwanzspitzen der Versuchstiere wurde genomische DNA isoliert und mit den Primern Wildtyp *forward*, Mutante *forward* und Mutante *reverse* in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Bei Wildtyptieren wurde ein Produkt von 690 bp und bei Caveolin-1-*Knockout*-Tieren von 410 bp amplifiziert. (B) Aorten der Wildtyp und Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse wurden mittels Western Blot Analysen auf die Anwesenheit des Caveolin-1 Proteins geprüft. In den Lysaten der Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse konnte Caveolin-1 nicht mehr nachgewiesen werden. (WT) Wildtyp, (Cav^{-/-}) Caveolin-1-*Knockout*-Maus.

Um zu prüfen, dass in Caveolin-1-Knockout-Mäusen kein Caveolin-1 vorhanden ist, wurde den Versuchstieren die Aorta entnommen, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Eine Immunfärbung gegen das Caveolin-1 Protein zeigte bei den Kontrolltieren eine 22 kDa große Bande. Bei den Caveolin-1-*Knockout*-Mäusen wurde keine Bande detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Somit wurde gezeigt, dass in Caveolin-1-*Knockout*-Mäusen Caveolin-1 nicht exprimiert wird.

4.4.1 Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus

Es wurden Endothelzellen aus der *Arteria carotis communis* der Caveolin-1-*Knockout*-Maus isoliert und die Auswirkungen des genetischen *Knockouts* des Caveolin-1-Gens auf die Funktion der K_{Ca}-Kanäle K_{Ca}2.3 und K_{Ca}3.1 auf zellulärer Ebene mittels Patch-Clamp-Experimente im Whole-Cell-Modus mit Hilfe von Michael Kacik vorgenommen. Ein Nachweis der verschiedenen Subtypen der K_{Ca}-Kanäle erfolgte durch Zugabe von Blockersubstanzen mit unterschiedlicher Spezifität für die jeweiligen K_{Ca}-Kanäle. Eine Blockade des K_{Ca}2.3 erfolgte mittels UCL 1684. Für K_{Ca}3.1 wurde die Blockersubstanz TRAM-34 eingesetzt.

Zur Aktivierung der K_{Ca}-Ströme wurden die Zellen mit einer Patchpipettenlösung, die eine freie 3 μM [Ca²⁺] enthielt, dialysiert. Bei den Wildtyptieren (Caveolin-1 WT) konnten so Ca²⁺-aktivierte K⁺-Auswärtsströme erzeugt werden, die eine leichte Einwärtsrektifizierung aufwiesen. Das Umkehrpotential dieser Ca²⁺-aktivierten Ströme lag bei ca. -80 mV und somit beim zu erwartenden Kaliumgleichgewichtspotential bei

einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM und einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 140 mM/L.

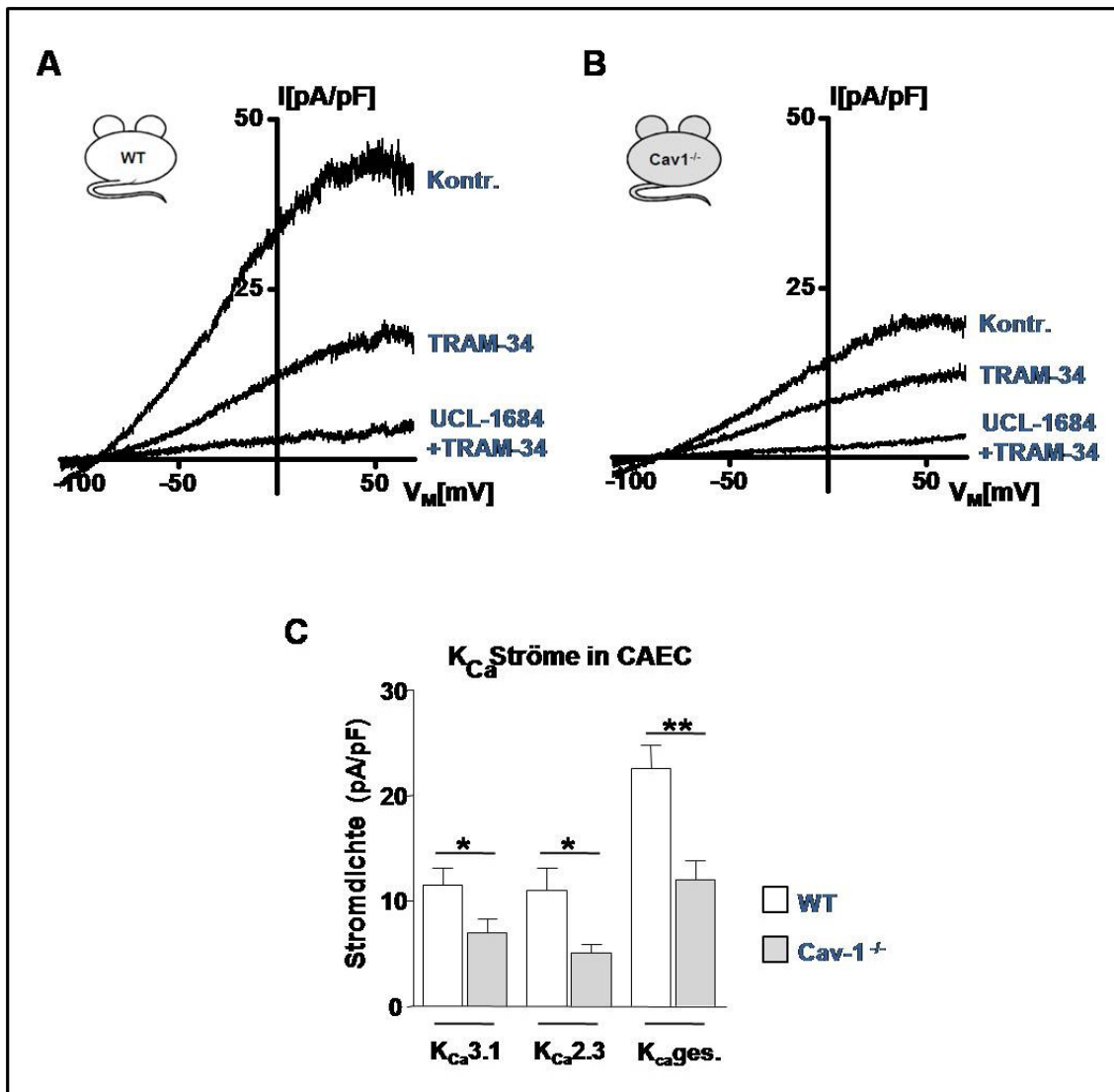


Abbildung 4-14: Verlust von Caveolin-1 führt zu reduzierten K_{Ca}-Funktionen an frisch isolierten Endothelzellen aus der Arteria carotis communis der Maus.

(A+B) Repräsentative Whole-Cell Messungen von K_{Ca}-Strömen an frisch isolierten Endothelzellen aus der Arteria carotis communis von Caveolin-1-Knockout- und Wildtyp-Mäusen. Zur Aktivierung der K_{Ca}-Ströme wurden die Zellen mit einer Patchpipettenlösung, die 3 μ M [Ca²⁺] frei enthielt, dialysiert. Um den K_{Ca}-Gesamtstrom aufzulösen, wurden die Blocker Tram-34 (1 μ mol/L) zur selektiven Blockade von K_{Ca}3.1 und UCL 1684 (200 nmol/L) zur selektiven Blockade von K_{Ca}2.3 in die Badlösung gegeben. (C) Statistische Zusammenfassung der Ergebnisse bei 0 mV für alle Gruppen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen CAEC der Caveolin-1-Knockout-Mäuse eine Reduktion der K_{Ca}2.3-Stromdichte von ~ 54 % ($5,1 \pm 0,7$ vs. $11,1 \pm 2,1$ pA/pF), der K_{Ca}3.1-Stromdichte von ~ 40 % ($7,0 \pm 1,3$ vs. $11,5 \pm 1,6$ pA/pF) und der gesamten K_{Ca}-Stromdichte von ~ 47 % ($12,1 \pm 1,7$ vs. $22,6 \pm 2,2$ pA/pF). (Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM; n = 8-9 für jeden Punkt; * p<0,05, **p<0,01).

Zum Nachweis, dass es sich bei den gemessenen Strömen der Wildtypzellen um K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3 handelt, wurden die Blockersubstanzen TRAM-34 zur selektiven

Blockierung von $K_{Ca3.1}$ und UCL 1684 zur selektiven Blockierung von $K_{Ca2.3}$ in die Badlösung gegeben. Mit $1 \mu\text{mol/L}$ TRAM-34 war etwa die Hälfte des Stroms inhibiert. Durch die Kombination von $1 \mu\text{mol/L}$ TRAM-34 und $1 \mu\text{mol/L}$ UCL 1684 konnte der Strom in den Wildtyp-Tieren nahezu vollständig unterdrückt werden (Abbildung 4-14 (A)).

Die statistische Auswertung in Abbildung 4-14 (C) zeigt, dass bei CAEC der Caveolin-1-*Knockout*-Tiere der K_{Ca} -Gesamtstrom gegenüber des kombinierten $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ -Stroms der Wildtyp-Tiere um etwa 47 % reduziert war. Eine Blockierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals mit TRAM-34 ermöglichte es, nur den $K_{Ca2.3}$ -Strom zu messen. Ein Vergleich der Caveolin-1-Wildtyp-Maus mit der Caveolin-1-*Knockout*-Maus zeigte, dass die $K_{Ca2.3}$ -Stromdichte in CAEC der Caveolin-1-*Knockout*-Tiere um ~ 54 % reduziert war. Eine Berechnung des $K_{Ca3.1}$ Stroms aus der Subtraktion des $K_{Ca2.3}$ Stroms von dem K_{Ca} -Gesamtstrom ergab, dass die $K_{Ca3.1}$ -Stromdichte in den Caveolin-1-*Knockout*-Mäusen um ~ 40 % gegenüber den Caveolin-1-Wildtyp-Mäusen reduziert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von Caveolin-1 und somit das Fehlen der räumlichen Struktur der Caveolae zu einer Reduzierung der K_{Ca} -Ströme führt.

5 Diskussion

Das Endothel zählt zu den wichtigsten Regulatoren des Gefäßtonus und des systemischen Blutdruckes. Es vermittelt die Endothel-abhängige Vasodilatation über die diffusiblen Moleküle Stickstoffmonoxid und Prostazyklin sowie den sogenannten *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF. Bis heute sind die molekulare Identität und die physiologischen Mechanismen dieses Faktors nicht abschließend geklärt. In den vergangenen Jahren wurden zwei Subtypen von Ca^{2+} aktivierten K^{+} Kanälen, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, als wichtige Bestandteile von EDHF deklariert (Triggle et al. 2012; Garland et al. 2011; Burnham et al. 2002; Bychkov et al. 2002). So konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass K_{Ca} -Kanäle niedriger ($\text{K}_{\text{Ca}2.3}$) und mittlerer ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) Leitfähigkeit bei der EDHF-Antwort eine wichtige Rolle spielen. Die Aktivierung der K_{Ca} -Kanäle erfordert jedoch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Neueste Studien zeigen, dass vor allem der mechanosensitive Calciumkanal TRPV4 einen möglichen Eintrittsweg für transmembranären Ca^{2+} -Einstrom darstellt und der K_{Ca} -Öffnung vorangeht bzw. diese aktiviert (Sonkusare et al. 2012; Triggle et al. 2012; Garland et al. 2011). Es wurde vorgeschlagen, dass K_{Ca} - und Ca^{2+} -durchlässige Kanäle in lokal begrenzten Bereichen mit der Zellmembran eine funktionelle Einheit bilden und dass Caveolae das Grundgerüst für diese Mikrokompartmentierung darstellen.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass TRPV4- und K_{Ca} -Kanäle in cholesterolreichen Mikrokompartmenten, den sogenannten Caveolae, angereichert sind und dort funktionelle Einheiten bilden, die eine schnelle und effiziente Integration der Signale erlauben. Eine Störung dieser Caveolaefunktion und des mechanosensitiven Funktionskomplexes führt zur endothelialen Dysfunktion und pathologischen Gefäßregulation.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$, jedoch nicht $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, unter statischen Bedingungen in der caveolären Membranfraktion von humanen mikrovaskulären Endothelzellen angereichert sind. Weiterhin fanden wir Indizien, dass TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ mit Caveolin-1, dem Hauptstrukturprotein der Caveolae, kolokalisieren. Unsere (Ko-)Immunpräzipitations-Daten weisen direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen Caveolin-1 mit TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ in stationär kultivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen nach. Im Einklang mit der Fluoreszenzmikroskopie konnte keine Assoziation von Caveolin-1 und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in HMEC-1 unter statischen Bedingungen gezeigt werden. Anhand von Immunpräzipitationsstudien fanden wir eine Protein-Protein-Interaktion zwischen

TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen und konnten zeigen, dass diese TRPV4/ $K_{Ca}2.3$ -Interaktion Caveolae-abhängig ist, da eine Zerstörung der caveolären Struktur zum Verlust der Protein-Protein-Interaktion führte. Interessanterweise führte die Applikation laminarer Schubspannung zu einer de novo Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1 und TRPV4. Unsere Patch-Clamp Daten an CACE der Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse zeigen, dass die K_{Ca} -Ströme in Endothelzellen der Caveolin-1-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert waren.

5.1 Auswahl des endothelialen Zellsystems

In der immortalisierten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 (CDC.EU.HMEC-1) konnte mittels RT-PCR sowohl die mRNA-Expression von Caveolin-1, dem Struktur- und Markerprotein der Caveolae, wie auch von dem mechanosensitiven TRPV4-Calciumkanal und von den an der EDHF-vermittelten Vasodilatation beteiligten K_{Ca} -Kanälen, $K_{Ca}3.1$ und $K_{Ca}2.3$, nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass eine Monokultur vorlag, wurde die typische Morphologie der Endothelzellen mit Bildung eines Pflastersteinreliefs aus homogenen, etwa gleich großen ($35 \times 50 \mu m$) polyklonal Zellen gefordert. Die Expression von eNOS, einem Endothelzellmarker, bestätigt, dass es sich um Endothelzellen handelt. Das Fehlen von MyhHC, einem Markerprotein für glatte Gefäßmuskelzellen, schließt eine Kontamination mit diesem Zelltyp aus und bestätigt die Reinheit der Monokultur. Eine Kontamination der Kultur konnte durch striktes steriles Arbeiten verhindert werden. Im Einklang mit der Literatur konnten wir die Expression von Caveolin-1 in den immortalisierten HMEC-1 nachweisen (Cordero et al. 2014; Santibanez et al. 2008; Liu et al. 2002). Somit war sichergestellt, dass diese humane Zelllinie ein gutes endotheliales Zellmodell für Charakterisierungsstudien der Caveolae darstellt. Zudem ist in der Literatur vielfach beschrieben, dass die K_{Ca} -Kanäle $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ im Endothel verschiedener Spezies und Gefäßsystemen exprimiert werden. In Ergänzung zu den elektrophysiologischen und immunhistochemischen Daten von Gao und seinen Mitarbeitern (Goa et al. 2012) konnte in dieser Arbeit die Expression des $K_{Ca}2.3$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. Unterstützend konnte in der eigenen Arbeitsgruppe bereits die Expression und Funktionalität des $K_{Ca}2.3$ mittels elektrophysiologischen und mRNA-Expressionsstudien in der Halsschlagader der Ratten gezeigt werden (Köhler et al. 2001). Durch eine Kombination aus elektrophysiologischen und immunhistochemischen Analysen konnte

K_{Ca}2.3 auch in der Mesenterialarterie der Maus nachgewiesen werden (Taylor et al. 2003). Des Weiteren wurde die Expression des K_{Ca}2.3 im Endothel der Herzkranzarterie von Schweinen mittels elektrophysiologischen Studien, mRNA Expressionsanalysen und Immunhistochemie belegt (Absi et al. 2007; Burnham et al. 2002). Die Daten der vorliegenden Arbeiten zeigen weiterhin, dass K_{Ca}3.1 in immortalisierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird und verifizieren vorherige Expressionsstudien in der eigenen Arbeitsgruppe (Grgic et al. 2005). Andere Arbeitsgruppen wiesen die Expression des K_{Ca}3.1-Proteins im humanen, bovinen und rodenten Endothel mittels Immunhistochemie, mRNA Expressionsanalysen und Elektrophysiologie nach (Köhler et al. 2000; Burnham et al. 2002; Weston et al. 2005). Der mechanosensitive TRPV4-Calciumkanal wurde erstmalig von Nilius und seinen Mitarbeitern in der Aorta der Maus nachgewiesen (Watanabe et al. 2002, Voets et al. 2002). Seitdem haben verschiedene Studien gezeigt, dass TRPV4 ubiquitär in Endothelzellen großer Gefäße und kleiner Widerstandsgefäße exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von TRPV4 in HMEC-1 nachgewiesen werden. In der eigenen Arbeitsgruppe zeigten Köhler und seine Mitarbeiter bereits die Expression und Funktion von TRPV4 an primären Rattenendothelzellen der Halsschlagader durch die Verwendung von *in situ* Patch-Clamp Techniken, der Einzelzell RT-PCR und des Druckmyographen (Köhler et al. 2006). Tatsächlich konnte mittels RT-PCR, Western Blot Analysen und intrazellulären Calciummessungen gezeigt werden, dass TRPV4 funktionell in Endothelzellen der Mausearten exprimiert wird. Hierbei handelt es sich allerdings überwiegend um Studien an primären Endothelzellen. Bei der Zelllinie HMEC-1 handelt es sich jedoch um immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzellen, die von Ades und Mitarbeitern mit einem PBR-322-Plasmid inklusive dem Genprodukt Simian Virus 40 A stabil transfiziert wurden (Ades et al. 1992). Diese Zelllinie wurde 1992 im Center for Disease Control in Atlanta, USA, etabliert und beschrieben. Die Verwendung der Zelllinie HMEC-1 bietet den Vorteil, dass sie kommerziell erhältlich ist, die schwierige Isolation der Endothelzellen aus den Gefäßen entfällt und vom Hersteller eine sehr hohe Reinheit der Zelllinie garantiert wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass immortalisierte Endothelzellen schneller wachsen und auch in höheren Passagen keine Anzeichen von Seneszenz zeigen, während primäre mikrovaskuläre Endothelzellen sehr schnell Alterungsprozesse aufweisen. Bei der generierten Endothelzelllinie HMEC-1 handelt es sich um eine gut etablierte und oft verwendete Zelllinie, die anhand ihrer Morphologie, ihrem Phänotyp und ihrer Funktionalität charakterisiert wurde. Hohe Übereinstimmungen der Endothelzellmarker zwischen primären und immortalisierten Endothelzellen weisen darauf hin, dass die generierte

Zelllinie HMEC-1 ein gutes Modell für Studien an primären mikrovaskulären Endothelzellen darstellt (Bouis et al. 2001; Ades et al. 1992).

Zusammenfassend konnten wir im Einklang mit der Literatur die Expression von Caveolin-1, den K_{Ca} -Kanälen $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ sowie von TRPV4 in den verwendeten HMEC-1 nachweisen und bestätigen, dass das eingesetzte humane Endothelzellsystem eine optimale Alternative zum primären *in vitro* Modellsystem darstellt.

5.2 $K_{Ca2.3}$ - und TRPV4-Kanäle sind in Caveolae humaner mikrovaskulärer Zellen angereichert

Caveolae stellen eine Art Anreicherungsstelle dar, da sie neben dem Strukturprotein Caveolin-1, Cholesterol und Sphingolipiden eine Vielzahl verschiedener anderer Proteine, die an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind, beinhalten. Sie fungieren als Signalplattform, in der eine große Anzahl an Signalmolekülen direkt miteinander interagieren können. Es gibt vermehrt Hinweise, dass wichtige Akteure der NO- und EDHF-vermittelten Vasodilatation räumlich und funktionell innerhalb endothelialer Caveolae angereichert sind. Zur näheren Charakterisierung der caveolären und nicht-caveolären Membrandomänen in Bezug auf die Verteilung der K_{Ca} -Kanäle, $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$, und den TRPV4-Calciumkanal, wurden Plasmamembranen der HMEC-1 mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation in eine caveoläre und nicht-caveoläre Membranfraktionen getrennt und mittels immunhistochemischen Methoden analysiert. Frühere Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass unter statischen Bedingungen $K_{Ca2.3}$ und eNOS in der caveolären Membranfraktion und $K_{Ca3.1}$ in der nicht-caveolären Membranfraktion der humanen mikrovaskulären Endothelzellen konzentriert sind (Goedicke-Fritz et al. 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPV4 in der caveolären Membranfraktion der humanen mikrovaskulären Endothelzellen aus Widerstandsgefäßen angereichert ist. Eine erfolgreiche Trennung war an der hohen Expression des Marker- und Strukturproteins Caveolin-1 oder dessen Fehlen zu erkennen. Somit konnte die Anreicherung von $K_{Ca2.3}$ in der caveolären Fraktion in HMEC-1 verifiziert und die von TRPV4 neu nachgewiesen werden. Zu den entscheidenden Eigenschaften der caveolären Membranfraktionen gehören eine geringe Dichte und die Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien wie in 1 %-igem Triton X-100 bei 4 °C (Brown et al. 1992). Bei der erstmals von Lisanti und Mitarbeitern beschriebenen Methode erfolgt eine Auftrennung des Zellhomogenisat über einen diskontinuierlichen 5-35 %-igen Sucrose-Dichtegradienten (Lisanti et al.

1994). Allerdings bringt die Verwendung von Triton X-100 den Nachteil mit sich, dass es die Struktur nativer Proteine und Membranen verändern kann und somit die Bildung von intramembranösen Artefakten begünstigt. Außerdem gibt es Hinweise, dass die niedrige Temperatur von 4°C zusammen mit Triton X-100 das Verhalten von Membranen zu stark beeinflusst. Andere Autoren gehen davon aus, dass jede Art von Detergenz Lipid/Protein-Aggregate in ihrer nativen Form verändern würde. Wegen dieser kritischen Betrachtung wurde für die Isolierung der caveolären Membran eine Detergenz-freie Methode angewendet, die von Song und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde (Song et al. 1996). Diese bestand darin, den Aufschluss der Zellen in Natriumkarbonat-Puffer bei einem pH-Wert von 11.0 durchzuführen. Der hohe pH-Wert dient dabei zur Entfernung von peripheren Membranproteinen. Somit konnte eine Änderung der Struktur nativer Proteine und Membranen sowie die Bildung intramembranöser Artefakte nahezu ausgeschlossen werden.

Als wichtiger Bestandteil von EDHF werden die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, die für Ca^{2+} -abhängige Signalprozesse verantwortlich sind, angesehen (Triggle et al. 2012; Garland et al. 2011; Burnham et al. 2002; Bychkov et al. 2002). Die Literatur lieferte erste Hinweise, dass K_{Ca} -Kanäle mittlerer und geringer Leitfähigkeit in unterschiedlichen Kompartimenten der Endothelzellen lokalisiert sind. An frisch isolierten Endothelzellen aus der Mesenterialarterie der Maus wurde gezeigt, dass $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ in der caveolären Membranfraktion und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in der nicht-caveolären Membranfraktion angereichert ist (Absi et al. 2007; Weston et al. 2005). In Einklang mit der Literatur zeigen frühere Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe, dass eNOS und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ in der caveolären und β -Adaptin und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in der nicht-caveolären Membranfraktion humaner mikrovaskulärer Endothelzellen angereichert sind (Goedicke-Fritz et al. 2015). Der Aktivierung der K_{Ca} -Kanäle geht ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration voraus. Neuere Studien zeigen, dass vor allem der mechanosensitive Calciumkanal TRPV4 einen möglichen Eintrittsweg für transmembranären Ca^{2+} Einstrom darstellt und der K_{Ca} -Öffnung vorangeht bzw. diese aktiviert (Sonkusare et al. 2012; Triggle et al. 2012; Garland et al. 2011). Interessanterweise sind eine Vielzahl von Molekülen, die für Ca^{2+} -Abwicklung verantwortlich sind, in Caveolae der Endothelzellen kompartimentiert. Isshiki und seine Mitarbeiter zeigten anhand von Ca^{2+} -Messungen an Endothelzellen, dass der Ca^{2+} -Eintritt und die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion im Bereich der Caveolae stattfinden (Isshiki et al. 1998). Darüber hinaus liefern eine Reihe von Studien erste Hinweise, dass eine Zerstörung der caveolären Struktur, etwa mit Methyl- β -Cyclodextrin, die Kapazität des Ca^{2+} -Einstroms signifikant hemmt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Caveolin-1 eine Rolle bei der Regulierung des Calcium-Eintritts bei Endothelzellen

spielt. Tatsächlich sind in Caveolae regulierende Moleküle wie der IP_3 -Rezeptor (IP_3 -R; Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor), Ca^{2+} ATPase, heterotrimere GTP-bindende Proteine und einige Isoformen der transient receptor potential Kanalfamilie (TRP) angereichert. Saliez und Mitarbeiter beschrieben erstmalig eine Anreicherung von TRPV4 in der caveolären Membranfraktion von venösen Endothelzellen (HUVEC) (Saliez et al. 2008). Im Einklang mit diesen Daten zeigt die vorliegende Arbeit, dass auch in humanen Endothelzellen aus Widerstandsgefäßen TRPV4 in der caveolären Membranfraktion angereichert ist.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass TRPV4 in der caveolären Membranfraktion angereichert und neben eNOS und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ in Caveolae der humanen mikrovaskulären Endothelzellen aus Widerstandsgefäßen kompartimentiert ist.

5.3 Caveolin-1 kolokalisiert unter statischen Bedingungen mit $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und TRPV4, aber nicht mit $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, in humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Caveoline stellen ein wichtiges Strukturelemente von Caveolae dar und gelten als putative Strukturproteine, die eine Kompartimentierung und Ansammlung verschiedener Signal-Moleküle innerhalb der caveolären Membranen einschließlich eNOS und der kleinen GTPase ermöglichen. Sie fungieren als Signalplattform, in der eine große Anzahl an Signalmoleküle miteinander interagieren können. Um zu prüfen, ob Caveolin-1 mit TRPV4 und den K_{Ca} -Kanälen $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen räumlich assoziiert sind, wurde eine Doppelfärbung der HMEC-1 mit Caveolin-1 und TRPV4, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ oder $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ durchgeführt. Die Ergebnisse der konventionellen Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte die Expression der Proteine Caveolin-1, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$, $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und TRPV4 in HMEC-1 und lieferte erste Hinweise einer räumlichen Assoziation von Caveolin-1 mit $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und TRPV4. Jedoch handelt es sich bei Caveolae um kleine Strukturen, die mit der konventionellen Mikroskopie nur begrenzt darstellbar sind. Die neue hochauflösende Mikroskopietechnik am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie ermöglicht es, Ultrastrukturen zu zeigen. Mit Hilfe der hochauflösenden Immunfluoreszenzmikroskopie konnten wir unter statischen Bedingungen eine teilweise enge räumliche Zuordnung von Caveolin-1 mit TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ aber nicht mit $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in humanen Endothelzellen beobachten. Eine Erklärung für die vergleichsweise schwachen Signale könnte darin zu sehen sein, dass es sich um endogen exprimiertes Protein handelt und

kein Überexpressionsmodell verwendet wurde. Im Vergleich mit anderen Methoden der Proteinanalyse bietet die Immunfluoreszenzmikroskopie den Vorteil, dass die Integrität der Zelle erhalten bleibt und die Proteine Strukturen zuordbar sind. Wir haben uns für die indirekte Immunfluoreszenz entschieden, da hier im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz einen Primärantikörper mehrere konjugierte Sekundärantikörper binden können und so eine Verstärkung der Fluoreszenzsignals ermöglicht wird (Lamvik et al. 2001). Somit lassen sich durch den Einsatz der Sekundärantikörper auch Proteine darstellen, die eine geringe Expressionsrate haben. Des Weiteren ermöglicht der Einsatz verschiedener Sekundärantikörper, dass mehrere Zielstrukturen visualisiert werden können. In dieser Arbeit konnte neben der konventionellen Immunfluoreszenz erstmalig mit hochauflösender Immunfluoreszenz-mikroskopie gezeigt werden, dass in stationär gehaltenen humanen mikrovaskulären Endothelzellen Caveolin-1 mit $K_{Ca}2.3$ und TRPV4, aber nicht mit $K_{Ca}3.1$, räumlich eng assoziiert ist. Absi und seine Mitarbeiter konnten in einer Studie mit Hilfe der konventionellen Immunfluoreszenz an frisch isolierten nativen Endothelzellen aus der Koronararterie des Schweins erste Hinweise finden, dass eine räumliche Zuordnung zwischen Caveolin-1 und $K_{Ca}2.3$, jedoch nicht zwischen Caveolin-1 und $K_{Ca}3.1$, besteht (Absi et al. 2007). Eine räumliche Assoziation von Caveolin-1 und TRPV4 wurde ebenfalls bisher nur mit Hilfe der konventionellen Immunfluoreszenz in HUVEC beschrieben (Ma et al. 2010). Ein Nachteil der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht jedoch in der limitierten Auflösung. Bereits 1873 publizierte der deutsche Physiker Ernst Abbe die Theorie der Auflösungsgrenze und zeigte die Grenzen der konventionellen Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie auf (Abbe et al. 1873). Liegen zwei Objekte näher als 200 nm in der xy-Achse und 500 nm in der z-Achse, so erscheinen sie für den Betrachter als einziger verwaschener Bildpunkt. Diese Beobachtung ist unter dem Begriff *point spread function* bekannt. Da die Größe der Caveolae jedoch nur bei etwa 50 - 100 nm liegt, ist es schwer mit der herkömmlichen Immunfluoreszenzmikroskopie zwei benachbarte Punkte innerhalb der Caveolae als getrennte Objekte darzustellen. Jedoch bieten neuartige Hochauflösungsmikroskope, wie das Leica SR GSD (*ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*) die Möglichkeit, dies zu überwinden. Unter optimalen Bedingungen können Auflösungen von bis zu 20 nm erreicht werden, die somit weit unterhalb der Beugungsgrenzen der bisherigen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie liegen und der Elektronenmikroskopie bereits sehr nahe kommen. Das Leica SR GSD basiert auf der GSDIM-Technologie (*Ground State Depletion followed by Individual Molecule return*). Die Bestimmung der exakten Position eines Fluoreszenzfarbstoffes beruht auf dem Prinzip der zeitlichen Trennung zwischen einem „ON“- und „OFF“-Zustand. Der Zustand eines Fluoreszenzmoleküls

wird fortlaufend ausgelesen und durch die Rekonstruktion aus tausenden Einzelbildern entsteht ein hochaufgelöstes Bild. Einer der wesentlichen Vorteile der GSDIM-Technologie ist, dass sie mit den herkömmlichen Fluoreszenzmarkern auskommt. Ein Nachteil besteht darin, dass im Gegensatz zur konventionellen Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie nur ein Teilausschnitt der Zelle darstellbar ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unter statischen Bedingungen Caveolin-1 mit $K_{Ca2.3}$ und TRPV4, aber nicht mit $K_{Ca3.1}$, in Caveolae humaner mikrovaskulärer Endothelzellen räumlich eng assoziiert sind. Diese Daten stützen unsere Vorstellung, dass TRPV4- und $K_{Ca2.3}$ -Kanäle, die funktionell zusammen hängen, auch räumlich assoziiert sind - also die Caveolae als Mikrokompartiment fungiert, in der die funktionellen Einheiten in einer räumlichen Struktur angeordnet sind.

5.4 Caveolin-1 interagieren mit $K_{Ca2.3}$ und TRPV4, aber nicht mit $K_{Ca3.1}$, in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter statischen Bedingungen

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob neben der räumlichen Assoziation eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Strukturprotein Caveolin-1 und den Kanälen $K_{Ca2.3}$ und TRPV4 besteht. Hierzu haben wir Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Die Immunpräzipitation ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in zumindest *in vivo* ähnlichen Verhältnissen. Der Nachteil der Immunpräzipitation besteht darin, dass sich Proteine durch die Lyse der Zellen verändern oder sogar abgebaut werden. Um etwaige Proteindegradationen zu vermeiden, wurde die Lyse stets in Anwesenheit eines Proteaseinhibitors durchgeführt und die Proben während des gesamten Lyseprozesses im Eisbad kühl gehalten. Zudem wurde ein nichtionisches, nicht-denaturierendes Detergenz IGEPAL verwendet und die Detergenzkonzentration für eine wirkungsvolle Freisetzung des Antigens so niedrig wie möglich gehalten. Eine Validierung der Effizienz der Immunpräzipitation erfolgte durch den Nachweis von nativem Caveolin-1. Die Ergebnisse zeigen, dass Protein-Protein-Interaktionen von Caveolin-1 mit TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ bestehen. Für $K_{Ca3.1}$ konnte keine Protein-Protein-Interaktion mit Caveolin-1 unter statischen Bedingungen in HMEC-1 nachgewiesen werden. Die Literatur liefert Anhaltspunkte, dass Calcium-aktivierte Kaliumkanäle nicht nur in der Caveolae angereichert sind, sondern mit Caveolin-1 eine Protein-Protein-Interaktion eingehen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass in humanen mikrovaskulären

Endothelzellen eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Caveolin-1 und $K_{Ca}2.3$, jedoch nicht zwischen Caveolin-1 und $K_{Ca}3.1$, besteht. Protein-Interaktionsstudien von Absi und Mitarbeiter lieferten unterstützend zu unseren Daten Hinweise auf eine Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 und $K_{Ca}2.3$, jedoch nicht von Caveolin-1 und $K_{Ca}3.1$, in Endothelzellen der Koronararterie des Schweins (Absi et al. 2007). Im Einklang mit diesen Daten lieferte Gao und Mitarbeiter weitere Hinweise für eine Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 und $K_{Ca}2.3$ in einem Überexpressionsmodell in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) (Gao et al. 2012).

Die endotheliale Caveolae kompartimentiert zudem eine Vielzahl an Molekülen, die für Calcium-Signalprozesse verantwortlich sind. Übereinstimmend mit der Literatur konnte die vorliegende Arbeit in humanen mikrovaskulären Endothelzellen nicht nur die räumliche Assoziation, sondern auch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Caveolin-1 und TRPV4 nachweisen. Saliez und Mitarbeiter zeigten unterstützend zu unseren Daten, dass in venösen Endothelzellen eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Strukturprotein Caveolin-1 und dem mechanosensitiven Calciumkanal TRPV4 besteht (Saliez et al. 2008). In der Literatur weisen zudem Ca^{2+} -Messungen an Endothelzellen darauf hin, dass der Ca^{2+} -Eintritt und die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion im Bereich der Caveolae stattfinden (Isshiki et al. 2008). Dabei scheint vor allem Caveolin-1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Calciumeintrittes zu spielen (Murata et al. 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die EDHF-vermittelte Vasodilatation in isolierten Arterien der Caveolin-1-*Knockout*-Maus nicht mehr vorhanden war. Die Abwesenheit von Caveolin-1 wird mit einer Beeinträchtigung der Calciumhomöostase in Endothelzellen assoziiert, insbesondere mit einer verringerten Aktivität von Ca^{2+} -durchlässigen TRPV4 Kationenkanälen, die an der NO- und EDHF- vermittelten Vasodilatation beteiligt sind (Saliez et al. 2008).

Zwar gibt die Immunpräzipitation Auskunft über mögliche Interaktion von zwei Proteinen, jedoch kann keine Aussage getroffen werden, wie diese Interaktion stattfindet. Dazu sind detaillierte Untersuchungen der Struktur der beteiligten Proteine nötig. Bisher ist die genaue Protein-Protein-Interaktion von Caveolin-1 mit $K_{Ca}2.3$ und TRPV4 nicht näher beschrieben. Bekannt ist, dass Caveolin-1 eine 20 Aminosäuren (81-101) lange, am N-Terminus lokalisierte *Caveolin scaffolding domain* (CSD) enthält, die eine Interaktion sowohl mit sich selbst als auch mit einer Vielzahl an Proteinen, einschließlich der Familie der Src-Tyrosinkinasen, der Wachstums-Rezeptoren, der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ermöglicht. Die CSD erkennt und bindet dabei Proteine mit dem sogenannten Caveolin-1-bindenden Motiv ($\Phi X \Phi XXXX \Phi$, $\Phi XXXX \Phi XX \Phi$ oder

$\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$; Φ = Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, X = beliebige Aminosäure) (Couet et al. 1997). Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) war eines der ersten Nicht-Rezeptor-Proteine, das in der Caveolae der Plasmamembran gefunden wurde (Feron et al. 1996). Seither haben viele verschiedene *in vitro* Studien die Wechselwirkung zwischen Caveolin-1 und eNOS beschrieben und konnten belegen, dass eNOS mit der *Caveolin scaffolding domain* des Caveolin-1 interagiert (Garcia-Cardena et al. 1997; Ju et al. 1997). Die Interaktion von Caveolin-1 und eNOS führt zu einer signifikanten Verminderung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Diese Enzyminhibierung kann mittels einer positiven allosterischen Regulation durch Calcium-Calmodulin aufgehoben werden (Ju et al. 1997; Michel et al. 1997). Khanna und Mitarbeiter identifizierten bei den K_{Ca} -Kanälen $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ zudem einen C-terminalen Leucin-Zipper (Khanna et al. 1999). Es ist bekannt, dass Leucin-Zipper an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Kobe & Deisenhofer 1994) und Devor und Mitarbeiter zeigten, dass der C-terminale Leucin-Zipper der K_{Ca} -Kanäle für die korrekte Platzierung der Kanäle in der Plasmamembran verantwortlich ist (Syme et al. 2003). Neuere Studien zeigen, dass auch andere Mitglieder der TRP-Kanalfamilie in der Caveolae angereichert sind. So deuten Koimmunpräzitationsstudien von Caveolin-1 und TRPC1 auf eine Protein-Protein-Interaktion der beiden Proteine hin. Caveolin-1 hilft, dass TRPC1 in der Membran lokalisiert ist und reguliert die TRPC1 Kanalfunktion direkt über die *Caveolin scaffolding domain*. Bisher liegen keine kristallographischen oder Kernspin Resonanz (NMR)-Daten zur anatomischen Struktur von TRPV4 vor, die einen räumlichen Anhalt für Interaktionen bietet. Bekannt ist, dass das humane TRPV4 Polypeptid 871 Aminosäuren lang ist und sich sowohl die N- als auch C-terminale Domäne auf der zytosolischen Seite befinden. Die N-Terminale Domäne enthält sechs Ankyrin Repeat Domänen (ARD), welche an der Interaktion mit mehreren Proteinen beteiligt sein könnten (Verma et al. 2010). Zur Klärung der genauen Protein-Protein-Interaktion bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl der Calcium-aktivierte Kaliumkanal $K_{Ca2.3}$ als auch der mechanosensitive TRPV4-Calciumkanal mit Caveolin-1 nicht nur räumlich assoziiert sind, sondern eine Protein-Protein-Interaktion eingehen. Für $K_{Ca3.1}$ konnte unter statischen Bedingungen weder eine Protein-Protein-Interaktion noch eine räumliche Assoziation mit Caveolin-1 gezeigt werden.

5.5 TRPV4 und K_{Ca}2.3 Kanäle kolokalisieren und interagieren in Caveolae humaner Endothelzellen

Nachdem wir zeigen konnten, dass sowohl K_{Ca}2.3 als auch TRPV4 in der Caveolae angereichert sind, haben wir im nächsten Schritt geprüft, ob TRPV4 und K_{Ca}2.3 in der Membran von humanen mikrovaskulären Endothelzellen räumlich miteinander assoziiert sind und untereinander eine Protein-Protein-Wechselwirkung besteht. Diese Art der physischen Interaktion würde eine effizientere Signalübertragung zwischen zwei Molekülen erlauben. Aus diesem Grunde haben wir Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Immunpräzipitation durchgeführt. Doppel-Immunfärbungen und anschließende konventionelle Immunfluoreszenzmikroskopie suggerieren einen hohen Grad an Kolokalisation der beiden Kanalproteine in HMEC-1. Um das Niveau der Kolokalisation mit einer höheren Genauigkeit zu bestimmen, haben wir die GSDIM Technologie angewandt. Übereinstimmend mit der konventionellen Immunfluoreszenzmikroskopie konnte mit Hilfe der hochauflösenden Immunfluoreszenzmikroskopie ein hohes Maß an Kolokalisation zwischen TRPV4 und K_{Ca}2.3 in den Membranen von HMEC-1 im Submikrometerbereich gezeigt werden. Um neben der räumlichen Nähe eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Kanal-Proteinen zu prüfen, haben wir Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Eine Validierung der Effizienz der Immunpräzipitation erfolgte durch den Nachweis von nativem K_{Ca}2.3- bzw. TRPV4-Protein. Um spezifische Antigen-Antikörperreaktionen von unspezifischen Proteinbindungen unterscheiden zu können, wurden bei allen Immunpräzipitationen Kontrollen mitgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass neben der räumlichen Assoziation eine Protein-Protein-Interaktion zwischen K_{Ca}2.3 und TRPV4 besteht. In verschiedenen Studien ist ein Zusammenhang zwischen Ca²⁺-durchlässigen TRP-Kanälen und den Calcium-aktivierten Kaliumkanälen K_{Ca}2.3 oder K_{Ca}3.1 in Endothelzellen gezeigt. In der Literatur gibt es Indizien, dass TRPV4 in Abhängigkeit der Tierspezies funktionell mit jeweils einem dieser K_{Ca}-Kanälen verbunden ist (Sonkusare et al. 2012; Bagher et al. 2012; Earley et al. 2009). Die vorliegende Arbeit belegt, dass eine Kolokalisation und Protein-Protein-Wechselwirkung von K_{Ca}2.3 und TRPV4 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen besteht. Durch die Verwendung des hochauflösenden Leica GSD Mikroskops zusätzlich zu der konventionellen Immunfluoreszenz, konnte erstmalig die Kolokalisation der beiden Kanäle im Submikrometerbereich dargestellt werden. Diese Daten stehen im Einklang mit der Literatur. In primären Endothelzellen der Mesenterialarterie der Maus (MACE, *primary mesenteric artery endothelial cells*) wurde gezeigt, dass TRPV4 mit K_{Ca}3.1 gekoppelt ist. Ma und seine Mitarbeiter lieferten mittels

konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunpräzipitationsversuchen erste Hinweise, dass in primären MAECs der Ratte eine Kolokalisation und Protein-Protein-Interaktion zwischen $K_{Ca}2.3$ und TRPV4 besteht.

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob diese Interaktion von der caveolären Struktur abhängig ist. Interessanterweise führt eine Zerstörung der caveolären Struktur durch Methyl- β -Cyclodextrin in humanen mikrovaskulären Endothelzellen zum Verlust der Protein-Protein-Interaktion von TRPV4 mit $K_{Ca}2.3$. Um die Caveolae in den mikrovaskulären Endothelzellen zu zerstören, wurden die HMEC-1 mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelt. Da Cholesterol eine kritische Rolle für die Bildung von Caveolae spielt, fehlen morphologisch identifizierbare Caveolae nach Behandlung von Zellen mit Agenzien wie Nystatin, Filipin und Cyclodextrin (Hailstones et al. 1998; Schnitzer et al. 1994; Rothberg et al. 1992). Caveolin-1 ist jedoch weiterhin in der Zellmembran vorhanden. Die Effizienz eines Cholesterolentzugs kann allerdings zwischen unterschiedlichen Zelltypen und Spezies variieren (Kilsdonk et al. 1995). Die in dieser Studie verwendete Methyl- β -Cyclodextrin-Konzentration wurde bereits erfolgreich an Endothelzellen eingesetzt (Absi et al. 2007). Der Behandlungseffekt wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Anschließend wurden erneut Interaktionsstudien mittels (Ko-)Immunpräzipitation durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit haben wir auf Proteinebene gezeigt, dass die Zerstörung der caveolären Struktur durch eine Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin zu einem Verlust der TRPV4/ $K_{Ca}2.3$ -Interaktion führt. Die Daten legen nahe, dass die TRPV4- $K_{Ca}2.3$ Interaktion von einer intakten caveolären Struktur abhängig ist. Absi und seine Mitarbeiter konnten mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation zeigen, dass die Behandlung von Mesenterialarterien der Ratte mit Methyl- β -Cyclodextrin zu einer Verschiebung der Anreicherung von Caveolin-1 innerhalb der Membranfraktionen im Vergleich zu den unbehandelten Arterien führte. Zudem resultierte die Zerstörung der Caveolae in einer verminderten EDHF-vermittelten, $K_{Ca}2.3$ -abhängigen Hyperpolarisation. Unsere Daten legen nahe, dass die TRPV4/ $K_{Ca}2.3$ -Interaktion nicht mehr vorhanden ist und daraus die verminderte EDHF-vermittelte Vasodilatation folgt. Mittels elektrophysiologischer Methoden konnten Lin und Mitarbeiter zeigen, dass eine Zerstörung der caveolären Struktur mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin zu einem verminderten $K_{Ca}2.3$ Strom führte (Lin et al. 2012).

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass TRPV4 und $K_{Ca}2.3$ in der Caveolae angereichert sind und dort nicht nur räumlich miteinander assoziiert sind, sondern eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Kanalproteinen besteht. Zerstört man die caveoläre Struktur durch einen Cholesterolentzug, geht die

TRPV4-K_{Ca}2.3 Interaktion verloren. Die caveoläre Struktur ist für die TRPV4-K_{Ca}2.3 Interaktion essentiell.

5.6 Applikation laminarer Schubspannung induziert eine *de novo* Assoziation von K_{Ca}3.1-Kanälen mit Caveolin-1 und TRPV4 in humanen Endothelzellen

Endothelzellen sind *in vivo* einer ständigen mechanischen Stimulation ausgesetzt. Dabei haben vor allem die hämodynamischen Kräfte, die durch die Blutströmung auf die Gefäßwand einwirken, eine entscheidende Bedeutung für die Steuerung verschiedener adaptiver Prozesse des vaskulären Systems. Die Antwort von Endothelzellen auf diesen physikalischen Stimulus stellt das Schlüsselglied für kurzfristige und langfristige Adaptionsvorgänge des Gefäßsystems dar. Um die in dieser Arbeit verwendeten humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter *in vivo* nahen Bedingungen zu kultivieren, erfolgte eine Stimulation der HMEC-1 für 24 Stunden mit einer laminaren Schubspannung von 15 dyn/cm². Gearbeitet wurde mit dem sogenannten Kegel-Platten-Viskosimeter und dem Flusskammer-System. In beiden kann ein homogenes Strömungsfeld auf der Zelloberfläche erzeugt werden. Bei dem sogenannten Plattenkegel handelt es sich um ein Kegel-Platten-System, bei dem Scherkräfte durch den rotierenden Kegel über das Medium auf die Endothelzellen übertragen werden (Morawietz et al. 2000; Schubert et al. 2000; Sdougos et al. 1982; Bussolari et al. 1982). Das Kegel-Platten-Viskosimeter ist das einfachste Modell und bietet den Vorteil, eine große Anzahl an Zellen pro Ansatz einzusetzen und wurde für die biochemische Auswertung angewendet. Bei den Flusskammern handelt es sich um zwei parallele Objektträger, die einen mit Endothelzellen bewachsenen und mit Medium durchströmten Flusskanal begrenzen. Die Flusskammern bieten den Vorteil, dass die Zellen darin sowohl kultiviert, als auch stimuliert, gefärbt und optisch hochauflösend mikroskopiert werden konnten. Als Wirkungsbeweis wurde die Zellausrichtung angeführt, sie ist der einfachste Indikator der Wirksamkeit einer Schubspannung und gibt schon *in vivo* Auskunft über ihre Qualität und Quantität (Nerem et al. 1981). Daten zur Zellausrichtung aus *in vitro* Experimenten sind zahlreich publiziert (Coan et al. 1993; Levesque & Nerem 1985; Dewey et al. 1981) und ließen sich im Kegel-Platten-Viskosimeter und im Flusskammer-Pumpsystem mit HMEC-1 reproduzieren. Die bisherigen Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass unter statischen, ungestressten Kulturbedingungen keine Kollokalisierung oder Protein-Protein-Interaktion von K_{Ca}3.1 mit Caveolin-1 besteht. Um zu prüfen, ob eine

mechanische Stimulation eine Auswirkung auf die Zusammensetzung des caveolären Mikrokompartmentes hat, wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen 24 Stunden mit einer laminaren Schubspannung von 15 dyn/cm^2 stimuliert. Endothelzellen sind das sensorische Element für Wandschubspannung in Blutgefäßen. Die Wahl der humanen mikrovaskulären Endothelzellen lässt sich dadurch begründen, dass EDHF vor allem in den kleineren Gefäßen wirkt und dort eine wichtige Rolle bei der Fluss-vermittelten Dilatation spielt. So führt die Erhöhung der Wandschubspannung in Widerstandsgefäßen verschiedener Spezies zu einer Vasodilatation (Pyke et al. 2005; Segal et al. 2005). Wie erwartet wiesen die Endothelzellen nach erfolgreicher Applikation der laminaren Schubspannung die typischen morphologischen Veränderungen einschließlich der Dehnung des Zellkörpers auf. Interessanterweise fanden wir anhand von (Ko-)Immunpräzipitationsstudien Indizien für eine *de novo* Protein-Protein-Interaktion zwischen $K_{Ca}3.1$ und Caveolin-1 in durch hämodynamische Kräfte stimulierten Endothelzellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Aufgrund der niedrigen Expression von $K_{Ca}3.1$, war nur eine leichte Bande detektierbar. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, haben wir mittels immunzytologischer Färbung und anschließender hochauflösender Immunfluoreszenzmikroskopie Kolokalisationsstudien mit $K_{Ca}3.1$ und Caveolin-1 durchgeführt. Nach Applikation laminarer Schubspannung auf HMEC-1 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der $K_{Ca}3.1$ /Caveolin-1 Kolokalisation im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Um sicher zu stellen, dass es sich nicht um eine zufällige Verschiebung der räumlichen Assoziation handelt, wurde eine Kolokalisationsstudie von Clathrin und $K_{Ca}3.1$ durchgeführt. Dabei konnte keine Veränderung der Kolokalisation von $K_{Ca}3.1$ mit Clathrin nachgewiesen werden. Die Daten legen nahe, dass dieser Effekt Caveolae-spezifisch zu sein scheint. Im nächsten Schritt untersuchten wir die Möglichkeit, dass sich die mechanische Herausforderung auch auf die räumliche Zuordnung von $K_{Ca}3.1$ und den Calcium-durchlässigen TRPV4-Kanal auswirkte. Durch die Verwendung der hochauflösenden Mikroskopie konnten wir in den Membranen der gestressten HMEC-1 eine deutliche Erhöhung der relevanten Kolokalisation von $K_{Ca}3.1$ und TRPV4 im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen nachweisen. Das Niveau der Kolokalisation von $K_{Ca}3.1$ /TRPV4 ähnelte dem von $K_{Ca}3.1$ /Caveolin-1 nach Applikation laminarer Schubspannung.

Der zu Grunde liegende Mechanismus dieser scheinbar induzierten Assoziation von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1 und TRPV4 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen ist unklar. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Applikation laminarer Schubspannung und die damit verbundene mechanische Stimulation eine Verschiebung des $K_{Ca}3.1$ von der nicht-caveolären Membranregion in die Caveolae bewirkt. Eine weitere Erklärung

wäre, dass neu synthetisierte $K_{Ca}3.1$ -Kanäle direkt in die Caveolae integriert werden. Oder die mechanische Herausforderung führt zur Bildung neuer Caveolae in ehemals nicht-caveolären, $K_{Ca}3.1$ haltigen Membranbereichen. Hierfür spricht, dass in Endothelzellen, die unter laminarer Schubspannung kultiviert wurden, die Zahl der Caveolae bemerkenswert ansteigt (Boyd et al. 2003; Isshiki et al. 2002; Sun et al. 2002). Zur Klärung des genauen Mechanismus bedarf es weiterer Untersuchungen.

Eine weitere offene Frage ist, warum sich die Zusammensetzung des caveolären Mikrokompartiments ändert. Es ist verwunderlich, dass die Endothelzelle zwei ähnliche K_{Ca} -Kanäle exprimiert, die sich in Aufbau und Funktion kaum unterscheiden. Es ist denkbar, dass $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ unterschiedliche Funktionen im Endothel in Bezug auf die caveoläre TRPV4/ K_{Ca} -Verbindung und EDHF-Antwort bedienen. So könnte etwa die vorherrschende caveoläre Assoziation von $K_{Ca}2.3$ und TRPV4 der Dauerzustand in den ungestressten humanen mikrovaskulären Endothelzellen sein, die jedoch eine in ihrem Funktionsumfang begrenzte Einheit darstellt. Die zusätzliche TRPV4/ $K_{Ca}3.1$ -Verbindung, die vor der Applikation laminarer Schubspannung nicht nachweisbar war, könnte eine Art adaptives System sein. Kommt es zu einer Erhöhung des mechanischen Reizes auf die Endothelzelle, bewirkt dies die neue caveoläre Assoziation von TRPV4 und $K_{Ca}3.1$. Somit könnten der K^+ -Ausstrom und die Hyperpolarisation erhöht und eine EDHF-Antwort gewährleistet werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine hämodynamische Stimulation mit laminarer Schubspannung zu einer *de novo* Assoziation und Interaktion von $K_{Ca}3.1$ mit Caveolin-1 und TRPV4 in Caveolae humaner mikrovaskulärer Endothelzellen führt. Hiermit unterstützen unsere Daten das Konzept einer dynamischen Mikrokompartmentierung von TRPV4/ K_{Ca} in endothelialen Caveolae.

5.7 Caveolin-1-Deletion *in vivo* führt zu einer Abnahme der endothelialen K_{Ca} -Funktionen

Um die Relevanz der Caveolae und der Caveolae-zugehörigen Vorrichtungen für die endothelabhängige Vasodilatation zu untersuchen, wurden K_{Ca} -Kanäle frisch isolierter Endothelzellen aus der Caveolin-1-*Knockout*-Maus und dem Wildtypen elektrophysiologisch untersucht. Als Nachweis, dass das Fehlen des Strukturproteins Caveolin-1 zu einer Änderung der endothelialen K_{Ca} -Ströme führt, dienten Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus an frisch isolierten Endothelzellen aus der *Arteria carotis communis* (A.c.c.) der Maus. Die für das vorliegende Projekt

durchgeführten Patch Clamp Daten wurden federführend durch Herrn Dr. Kacik erstellt. Ich wurde in diese Arbeiten mit einbezogen.

In den Patch-Clamp-Experimenten konnten bei Wildtyptieren Ca^{2+} -aktivierte K^{+} -Auswärtsströme beobachtet werden, die nicht spannungssensitiv waren, eine leichte Einwärtsrektifizierung zeigten und zu einer Hyperpolarisation führten. Somit wiesen die gemessenen Ströme die typischen Charakteristika von $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ auf. UCL 1684 und TRAM-34 werden als selektive Blocker der beiden Ionenkanäle angesehen. Auch in diesen Patch-Clamp Experiment führte die Kombination beider Blocker in der Badlösung zu einer wirkungsvollen Blockade des Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Stroms.

In den Endothelzellen, bei denen Caveolin-1 fehlte, war der K_{Ca} -Gesamtstrom um etwa ~47 % gegenüber den Wildtypen vermindert. Parallel zu der eigenen Arbeit zeigten in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführte elektrophysiologischen Daten, dass die durch laminare Schubspannung induzierte endothelabhängige Vasodilatation, welche hauptsächlich auf die Funktion von $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ zurückzuführen ist (Brähler et al. 2009; Si et al. 2006), in Carotiden der Caveolin-1-*Knockout*-Maus im Wesentlichen vermindert war (Goedicke-Fritz et al. 2015). Ebenso wurde eine Beeinträchtigung der Agonisten-induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation, die ebenfalls durch K_{Ca} -Kanälen mediert wird, beobachtet (Brähler et al. 2009; Grgic et al. 2009a; Si et al. 2006). Auch Saliez und Kollegen beschreiben die Abwesenheit der EDHF-vermittelten Vasodilatation in Caveolin-1-*Knockout*-Mäusen (Saliez et al. 2008). Die Abwesenheit der caveolären Struktur führt zu verringerten K_{Ca} -Strömen und erklärt die verminderte EDHF-vermittelte Vasodilatation der Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse. Die gemessenen Einzelströme in den Endothelzellen der Caveolin-1-*Knockout*-Maus waren im Gegensatz zu den Wildtypen für $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ um ~54% und für $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ um etwa ~40 % reduziert.

Schlussfolgernd konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Caveolin-1 und somit der Struktur der Caveolae *in vivo* zu einem deutlichen Verlust der K_{Ca} -Ströme mittlerer und geringer Leitfähigkeit führt.

5.8 Zusammenfassende Beurteilung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$, jedoch nicht $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, unter statischen Bedingungen in der caveolären Membranfraktion von humanen mikrovaskulären Endothelzellen angereichert sind. Zudem fanden wir Hinweise, dass TRPV4 und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ mit Caveolin-1, dem Hauptstrukturprotein der Caveolae, kolokalisieren. Unsere (Ko-)Immunpräzipitations-Daten bestätigen zudem eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Caveolin-1,

TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ in stationär kultivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Im Einklang mit der Fluoreszenzmikroskopie konnte keine Assoziation von Caveolin-1 und $K_{Ca3.1}$ in HMEC-1 unter statischen Bedingungen gezeigt werden. Anhand von Immunpräzipitationsstudien fanden wir eine Protein-Protein-Interaktion zwischen TRPV4 und $K_{Ca2.3}$ in humanen mikrovaskulären Endothelzellen und konnten zeigen, dass diese TRPV4/ $K_{Ca2.3}$ -Interaktion von der caveolären Struktur abhängig ist, da eine Zerstörung der caveolären Struktur zum Verlust der Protein-Protein-Interaktion führte. Interessanterweise resultiert die Stimulation mit hämodynamischen Kräften zu einer *de novo* Assoziation von $K_{Ca3.1}$ mit Caveolin-1 und TRPV4. Unsere Patch-Clamp Daten an CACE der Caveolin-1-*Knockout*-Mäuse zeigen, dass die K_{Ca} -Ströme in Endothelzellen der Caveolin-1-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert waren.

Zusammenfassend unterstützen unsere Daten die Vorstellung eines dynamischen Mikrokompartmentes von Caveolin-1/TRPV4/ K_{Ca} in Caveolae von Endothelzellen und zeigen gleichzeitig die funktionelle Konsequenz für die strömungsinduzierte Vasodilatation. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die für die Assemblierung und Funktion dieses Mikrokompartmentes verantwortlich sind, verspricht neue Erkenntnisse über physiologische Regulationen des Vasotonus und könnte neue Anhaltspunkte über die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und des Bluthochdruckes schaffen.

6 Literaturverzeichnis

- Absi, M., Burnham, M. P., Weston, A. H., Harno, E., Rogers, M., Edwards, G. (2007). Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains. *Br J Pharmacol* 151: 332-340.
- Adams, D. J., Barakeh, J., Laskey, R., Van Breemen, C. (1989). Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J* 3, 2389-2400.
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-690.
- Alhenc-Gelas, F., Tsai, S. J., Callahan, K. S., Campbell, W. B., Johnson, A. R. (1982). Stimulation of prostaglandin formation by vasoactive mediators in cultured human endothelial cells. *Prostaglandins* 24: 723-742.
- Archer, S. L., Gragasin, F. S., Wu, X., Wang, S., McMurtry, S., Kim, D. H., Michelakis, E. D. (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation* 107: 769-776.
- Auer-Grumbach, M., Olschewski, A., Papic, L., Kremer, H., McEntagart, M. E., Uhrig, S., Guelly, C. (2010). Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet* 42: 160-164.
- Bagher, P., Beleznaï, T., Kansui, Y., Mitchell, R., Garland, C. J., Dora, K. A. (2012). Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca^{2+} events, and IK_{Ca} channels, reducing arteriolar tone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 18174-18179.
- Berggard, T., Linse, S., James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7: 2833-2842.
- Berk, B. C. (2008). Atheroprotective signaling mechanisms activated by steady laminar flow in endothelial cells. *Circulation* 117: 1082-1089.
- Bouis, D., Hospers, G. A., Meijer, C., Molema, G., Mulder, N. H. (2001). Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91-102.

- Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M., Jo, H. (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1113-1122.
- Brähler, S., Kaistha, A., Schmidt, V. J., Wolfle, S. E., Busch, C., Kaistha, B. P., Köhler, R. (2009). Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation* 119: 2323-2332.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 682-685.
- Bretschneider, S., Eggeling, C., Hell, S. W. (2007). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys Rev Lett* 98: 218103.
- Brown, D. A., Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544.
- Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., Sessa, W. C. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6: 1362-1367.
- Burgess, G. M., Claret, M., Jenkinson, D. H. (1981). Effects of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. *J Physiol* 317: 67-90.
- Burnham, M. P., Bychkov, R., Feletou, M., Richards, G. R., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H., Edwards, G. (2002). Characterization of an apamin-sensitive small-conductance $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated $\text{K}^{(+)}$ channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol* 135: 1133-1143.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23: 374-380.
- Busse, R., Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 27: 331-340.
- Busse, R., Trogisch, G., Bassenge, E. (1985). The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol* 80: 475-490.
- Bussolari, S. R., Dewey, C. F., Jr., Gimbrone, M. A., Jr. (1982). Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev Sci Instrum*, 53: 1851-1854.

- Bychkov, R., Burnham, M. P., Richards, G. R., Edwards G., Weston, A. H., Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (2002). Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol* 137: 1346-1354.
- Califano, J. P., Reinhart-King, C. A. (2010). Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior. *J Biomech* 43: 79-86.
- Cardno, A. G., Bowen, T., Guy, C. A., Jones, L. A., McCarthy, G., Williams, N. M., O'Donovan, M. C. (1999). CAG repeat length in the hKCa3 gene and symptom dimensions in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45: 1592-1596.
- Carver, L. A., Schnitzer, J. E. (2003). Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 3: 571-581.
- Carver, L. A., Schnitzer, J. E., Anderson, R. G., Mohla, S. (2003). Role of caveolae and lipid rafts in cancer: workshop summary and future needs. *Cancer Res* 63: 6571-6574.
- Caterina, M. J. (2007). Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R64-76.
- Chandy, K. G., Fantino, E., Wittekindt, O., Kalman, K., Tong, L. L., Ho, T. H., Gargus, J. J. (1998). Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder? *Mol Psychiatry* 3: 32-37.
- Chen, G., Suzuki, H., Weston, A. H. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165-1174.
- Chien, S. (2007). Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1209-1224.
- Coan, D. E., Wechezak, A. R., Viggers, R. F., Sauvage, L. R. (1993). Effect of shear stress upon localization of the Golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells. *J Cell Sci* 104: 1145-1153.
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84: 1341-1379.

- Colden-Stanfield, M., Schilling, W. P., Possani, L. D., Kunze, D. L. (1990). Bradykinin-induced potassium current in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 116: 227-238.
- Colden-Stanfield, M., Schilling, W. P., Ritchie, A. K., Eskin, S. G., Navarro, L. T., Kunze, D. L. (1987). Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 61: 632-640.
- Coleman, H. A., Tare, M., Parkington, H. C. (2001). K⁺ currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J Physiol* 531: 359-373.
- Coon, B. G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T. D., Fang, J. S., Schwartz, M. A. (2015). Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J Cell Biol* 208: 975-986.
- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., Lisanti, M. P. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272: 6525-6533.
- Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519-560.
- Delany, N. S., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., Tate, S. N. (2001). Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* 4: 165-174.
- Dewey, C. F., Jr., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A., Jr., Davies, P. F. (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103: 177-185.
- Dimitropoulou, C., West, L., Field, M. B., White, R. E., Reddy, L. M., Falck, J. R., Imig, J. D. (2007). Protein phosphatase 2A and Ca²⁺-activated K⁺ channels contribute to 11,12-epoxyeicosatrienoic acid analog mediated mesenteric arterial relaxation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 83: 50-61.
- Dobrin, P. B., Littooy, F. N., Endean, E. D. (1989). Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 105: 393-400.
- Dora, K. A., Sandow, S. L., Gallagher, N. T., Takano, H., Rummery, N. M., Hill, C. E., Garland, C. J. (2003). Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery. *J Vasc Res* 40: 480-490.

- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Kurzchalia, T. V. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.
- Earley, S., Pauyo, T., Drapp, R., Tavares, M. J., Liedtke, W., Brayden, J. E. (2009). TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1096-1102.
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., Weston, A. H. (1998). K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272.
- Edwards, G., Feletou, M., Gardener, M. J., Thollon, C., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H. (1999). Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128: 1788-1794.
- Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Niemeyer, B. A. (2004). Ca^{2+} -selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* 279: 34456-34463.
- Everaerts, W., Nilius, B., Owsianik, G. (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* 103: 2-17.
- Falcone, J. C., Kuo, L., Meininger, G. A. (1993). Endothelial cell calcium increases during flow-induced dilation in isolated arterioles. *Am J Physiol* 264: H653-659.
- Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Aiyar, J. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* 274: 5746-5754.
- Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93: 515-524.
- Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (2006a). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H985-1002.
- Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (2006b). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1215-1225.
- Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 117: 139-155.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A., Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810-22814.

- Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B., Michel, T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 273: 3125-3128.
- Fichtner, H., Frobe, U., Busse, R., Kohlhardt, M. (1987). Single nonselective cation channels and Ca^{2+} -activated K^+ channels in aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 98: 125-133.
- Figueroa, K. P., Chan, P., Schols, L., Tanner, C., Riess, O., Perlman, S. L., Pulst, S. M. (2001). Association of moderate polyglutamine tract expansions in the slow calcium-activated potassium channel type 3 with ataxia. *Arch Neurol* 58: 1649-1653.
- Folling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C. A., Hein, B., Hell, S. W. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Methods* 5: 943-945.
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., Parton, R. G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8655-8659.
- Frangos, J. A., Eskin, S. G., McIntire, L. V., Ives, C. L. (1985). Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227: 1477-1479.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., Une, T. (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113: 3509-3517.
- Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V., Jothianandan, D. (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: 336-343.
- Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Galizia, L., Pizzoni, A., Fernandez, J., Rivarola, V., Capurro, C., Ford, P. (2012). Functional interaction between AQP2 and TRPV4 in renal cells. *J Cell Biochem* 113: 580-589.
- Gao, Y., Bertuccio, C. A., Balut, C. M., Watkins, S. C., Devor, D. C. (2012). Dynamin- and Rab5-dependent endocytosis of a Ca^{2+} -activated K^+ channel, $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$. *PLoS One* 7: e44150.

- Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., Sessa, W. C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272: 25437-25440.
- Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24: 5307-5314.
- Garcia Cordero, J., Leon Juarez, M., Gonzalez, Y. M. J. A., Cedillo Barron, L., Gutierrez Castaneda, B. (2014). Caveolin-1 in lipid rafts interacts with dengue virus NS3 during polyprotein processing and replication in HMEC-1 cells. *PLoS One* 9: e90704.
- Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30: 653-654.
- Garland, C. J., Hiley, C. R., Dora, K. A. (2011). EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* 164: 839-852.
- Gaudet, R. (2007). Structural Insights into the Function of TRP Channels. In W. B. Liedtke S. Heller (Hrsg.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL).
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., Chandy, K. G. (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275: 37137-37149.
- Giamarchi, A., Padilla, F., Coste, B., Raoux, M., Crest, M., Honore, E., Delmas, P. (2006). The versatile nature of the calcium-permeable cation channel TRPP2. *EMBO Rep* 7, 787-793.
- Gibbons, G. H., Dzau, V. J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330: 1431-1438.
- Glagov, S., Zarins, C., Giddens, D. P., Ku, D. N. (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112:1018-1031.

- Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Kacik, M., Markert, S., Hofmeister, A., Busch, C., Hoyer, J. (2015). Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/KCa in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 94: 391-400.
- Grgic, I., Eichler, I., Heinau, P., Si, H., Brakemeier, S., Hoyer, J., Köhler, R. (2005). Selective blockade of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 704-709.
- Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J., Köhler, R. (2009). Endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol* 157: 509-526.
- Grygorczyk, R., Schwarz, W. (1983). Properties of the Ca^{2+} -activated K^+ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 4: 499-510.
- Gueguinou, M., Chantome, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., Potier-Cartereau, M. (2014). K_{Ca} and $\text{Ca}^{(2+)}$ channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta* 1843: 2322-2333.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., International Union of, P. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55: 583-586.
- Haas, T. L., Duling, B. R. (1997). Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc Res* 53: 113-120.
- Hailstones, D., Sleer, L. S., Parton, R. G., Stanley, K. K. (1998). Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 39: 369-379.
- Hartmannsgruber, V., Heyken, W. T., Kacik, M., Kaistha, A., Grgic, I., Harteneck, C., Köhler, R. (2007). Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. *PLoS One* 2: e827.
- Hassid, A. (1986). Atriopeptin II decreases cytosolic free Ca in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 251: C681-686.
- Hehlhans, S., Cordes, N. (2011). Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio-and chemoresistance. *Am J Cancer Res* 1: 521-530.

- Hell, S. W., Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19: 780-782.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118: 917-928.
- Helmlinger, G., Geiger, R. V., Schreck, S., Nerem, R. M. (1991). Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *J Biomech Eng* 113: 123-131.
- Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J* 22: 283-294.
- Himmel, H. M., Whorton, A. R., Strauss, H. C. (1993). Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21: 112-127.
- Ho, C. C., Huang, P. H., Huang, H. Y., Chen, Y. H., Yang, P. C., Hsu, S. M. (2002). Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 161: 1647-1656.
- Hong, S. L., Deykin, D. (1982). Activation of phospholipases A2 and C in pig aortic endothelial cells synthesizing prostacyclin. *J Biol Chem* 257: 7151-7154.
- Hoyer, J. (1997). Endothelial vasoregulation and mechanosensitive ion channels in hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 12: 6-8.
- Hoyer, J., Köhler, R., Distler, A. (1997). Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 30: 112-119.
- Hoyer, J., Köhler, R., Distler, A. (1998). Mechanosensitive Ca^{2+} oscillations and STOC activation in endothelial cells. *FASEB J* 12: 359-366.
- Hoyer, J., Köhler, R., Haase, W., Distler, A. (1996). Up-regulation of pressure-activated $\text{Ca}^{(2+)}$ -permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11253-11258.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269.
- Ikeuchi, Y., Nishizaki, T. (1995). ATP activates the potassium channel and enhances cytosolic Ca^{2+} release via a P2Y purinoceptor linked to pertussis toxin-insensitive G-protein in brain artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 1022-1028.

- Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11651-11656.
- Isshiki, M., Ando, J., Korenaga, R., Kogo, H., Fujimoto, T., Fujita, T., Kamiya, A. (1998). Endothelial Ca^{2+} waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5009-5014.
- Isshiki, M., Ando, J., Yamamoto, K., Fujita, T., Ying, Y., Anderson, R. G. (2002). Sites of $\text{Ca}^{(2+)}$ wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J Cell Sci* 115: 475-484.
- Jacob, R. (1990). Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* 421: 55-77.
- Jaggar, J. H., Wellman, G. C., Heppner, T. J., Porter, V. A., Perez, G. J., Gollasch, M., Nelson, M. T. (1998). Ca^{2+} channels, ryanodine receptors and $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated K^+ channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand* 164: 577-587.
- Johns, A., Lategan, T. W., Lodge, N. J., Ryan, U. S., Van Breemen, C., Adams, D. J. (1987). Calcium entry through receptor-operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Tissue Cell* 19: 733-745.
- Joiner, W. J., Wang, L. Y., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11013-11018.
- Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., Venema, R. C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272: 18522-18525.
- Juhasz, M., Chen, J., Tulassay, Z., Malfertheiner, P., Ebert, M. P. (2003). Expression of caveolin-1 in gastrointestinal and extraintestinal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 493-497.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217-223.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-17256.

- Kobe, B., Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 19: 415-421.
- Kogo, H., Fujimoto, T. (2000). Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett* 465: 119-123.
- Köhler, R., Brakemeier, S., Kuhn, M., Behrens, C., Real, R., Degenhardt, C., Hoyer, J. (2001). Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ Res* 89: 174-179.
- Köhler, R., Degenhardt, C., Kuhn, M., Runkel, N., Paul, M., Hoyer, J. (2000). Expression and function of endothelial $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated $\text{K}^{(+)}$ channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res* 87: 496-503.
- Köhler, R., Heyken, W. T., Heinau, P., Schubert, R., Si, H., Kacik, M., Hoyer, J. (2006). Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1495-1502.
- Köhler, R., Hoyer, J. (2007). Role of TRPV4 in the Mechanotransduction of Shear Stress in Endothelial Cells. In W. B. Liedtke S. Heller (Hrsg.), TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL).
- Köhler, R., Wulff, H., Eichler, I., Kneifel, M., Neumann, D., Knorr, A., Hoyer, J. (2003). Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108: 1119-1125.
- Koronyo-Hamaoui, M., Danziger, Y., Frisch, A., Stein, D., Leor, S., Laufer, N., Gak, E. (2002). Association between anorexia nervosa and the hSKCa3 gene: a family-based and case control study. *Mol Psychiatry* 7: 82-85.
- Kroutvar, M., von Guttenberg, Z., (2012a). Instruction manual for the ibidi heating system 1. *universal fit*.
- Kroutvar, M., von Guttenberg, Z., (2012b). Instruction manual for ibidi pump system. *universal fit*.
- Kuo, L., Davis, M. J., Chilian, W. M. (1990). Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 259: H1063-1070.

- Kwan, H. Y., Huang, Y., Yao, X. (2007). TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772: 907-914.
- Lacy, P. S., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H. J., Boyle, J. P., Thurston, H. (2000). Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 129: 605-611.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamvik, J., Hella, H., Liabakk, N. B., Halaas, O. (2001). Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry* 45: 187-193.
- Lansman, J. B., Hallam, T. J., Rink, T. J. (1987). Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325: 811-813.
- Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., Nelson, M. T. (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* (Bethesda) 21: 69-78.
- Levesque, M. J., Nerem, R. M. (1985). The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 107: 341-347.
- Li, S., Song, K. S., Lisanti, M. P. (1996). Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem* 271: 568-573.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-535.
- Liedtke, W., Kim, C. (2005). Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! *Cell Mol Life Sci* 62: 2985-3001.
- Liedtke, W. B. (2007). TRPV Channels' Function in Osmo- and Mechanotransduction. In W. B. Liedtke S. Heller (Hrsg.), TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. *Boca Raton* (FL).
- Lin, M. T., Adelman, J. P., Maylie, J. (2012). Modulation of endothelial SK3 channel activity by $\text{Ca}^{(2)+}$ dependent caveolar trafficking. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C318-327.

- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-126.
- Liu, P., Rudick, M., Anderson, R. G. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277: 41295-41298.
- Logsdon, N. J., Kang, J., Togo, J. A., Christian, E. P., Aiyar, J. (1997). A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 32723-32726.
- Loot, A. E., Moneke, I., Keseru, B., Oelze, M., Syzonenko, T., Daiber, A., Fleming, I. (2012). 11,12-EET stimulates the association of BK channel alpha and beta(1) subunits in mitochondria to induce pulmonary vasoconstriction. *PLoS One* 7: e46065.
- Luckhoff, A., Busse, R. (1990). Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch* 416: 305-311.
- Luckhoff, A., Clapham, D. E. (1992). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel. *Nature* 355: 356-358.
- Luetterforst, R., Stang, E., Zorzi, N., Carozzi, A., Way, M., Parton, R. G. (1999). Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J Cell Biol* 145: 1443-1459.
- Lum, H., Malik, A. B. (1994). Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267: L223-241.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*.
- Luscher, T. F., Richard, V., Tschudi, M., Yang, Z. H., Boulanger, C. (1990). Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 15: 519-527.
- Ma, X., Qiu, S., Luo, J., Ma, Y., Ngai, C. Y., Shen, B., Yao, X. (2010). Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca^{2+} influx. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 851-858.

- Machleidt, T., Li, W. P., Liu, P., Anderson, R. G. (2000). Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J Cell Biol* 148: 17-28.
- Mackie, K., Lai, Y., Nairn, A. C., Greengard, P., Pitt, B. R., Lazo, J. S. (1986). Protein phosphorylation in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 128: 367-374.
- MacMillan-Crow, L. A., Murphy-Ullrich, J. E., Lincoln, T. M. (1994). Identification and possible localization of cGMP-dependent protein kinase in bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 531-537.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., Hamill, O. P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185.
- Mehta, D., Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86: 279-367.
- Mendoza, S. A., Fang, J., Gutterman, D. D., Wilcox, D. A., Bubolz, A. H., Li, R., Zhang, D. X. (2010). TRPV4-mediated endothelial Ca^{2+} influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H466-476.
- Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., Michel, T. (1997). Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272 25907-25912.
- Michel, T., Feron, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100 2146-2152.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., Kurzchalia, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6: 911-927.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Zhu, M. X. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9: 229-231.

- Montell, C., Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323.
- Montgomery, R. R., Shi, Q. (2012). Platelet and endothelial expression of clotting factors for the treatment of hemophilia. *Thromb Res* 129: 46-48.
- Morawietz, H., Talanow, R., Szibor, M., Rueckschloss, U., Schubert, A., Bartling, B., Holtz, J. (2000). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 525: 761-770.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-388.
- Murata, T., Lin, M. I., Huang, Y., Yu, J., Bauer, P. M., Giordano, F. J., Sessa, W. C. (2007). Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J Exp Med* 204: 2373-2382.
- Murray, C. J., Lopez, A. D. (2013). Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*, 369: 448-457.
- Nabi, I. R., Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161: 673-677.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Neher, E. (1992). Cell physiology. Controls on calcium influx. *Nature* 355: 298-299.
- Neher, E., Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633-637.
- Nerem, R. M. (1991). Shear force and its effect on cell structure and function. *ASGSB Bull* 4: 87-94.
- Newby, A. C., Henderson, A. H. (1990). Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 52: 661-674.
- Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116: 4707-4714.

- Nilius, B. (1991): Regulation of transmembrane calcium fluxes in endothelium. *News Physiol. Sci.* 6: 110-114
- Nilius, B., Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415-1459.
- Nilius, B., Droogmans, G., Gericke, M., Schwarz, G. (1993). Nonselective ion pathways in human endothelial cells. *EXS* 66: 269-280.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87: 165-217.
- Nilius, B., Riemann, D. (1990). Ion channels in human endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* 9: 89-111.
- Nilius, B., Viana, F., Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 59: 145-170.
- Nilius, B., Voets, T., Peters, J. (2005). TRP channels in disease. *Sci STKE* 2005: re8.
- Nollert, M. U., Eskin, S. G., McIntire, L. V. (1990). Shear stress increases inositol trisphosphate levels in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 281-287.
- Norkin, L. C. (2001). Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 301-315.
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1: 188-211.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Parton, R. G., Way, M., Zorzi, N., Stang, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136: 137-154.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38: 233-252.
- Pena, T. L., Rane, S. G. (1999). The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *J Membr Biol* 172: 249-257.

- Phillips, A. M., Bull, A., Kelly, L. E. (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8: 631-642.
- Plant, T. D., Strotmann, R. (2007). TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. In W. B. Liedtke S. Heller (Hrsg.), TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. *Boca Raton (FL)*.
- Podar, K., Tai, Y. T., Cole, C. E., Hideshima, T., Sattler, M., Hamblin, A., Anderson, K. C. (2003). Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 278: 5794-5801.
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., Bassenge, E. (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8: 37-44.
- Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H., Nakane, M., Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10480-10484.
- Popp, R., Hoyer, J., Meyer, J., Galla, H. J., Gogelein, H. (1992). Stretch-activated non-selective cation channels in the antiluminal membrane of porcine cerebral capillaries. *J Physiol* 454: 435-449.
- Pyke, K. E., Tschakovsky, M. E. (2005). The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 568: 357-369.
- Qian, J., Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol* 4: 347.
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B., Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174-176.
- Razani, B., Woodman, S. E., Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54: 431-467.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F., Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746-752.

- Risau, W., Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.
- Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E., Davies, P. F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1720-1729.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., Logothetis, D. E. (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8: 626-634.
- Rosa, J. C., Galanakis, D., Ganellin, C. R., Dunn, P. M., Jenkinson, D. H. (1998). Bis-quinolinium cyclophanes: 6,10-diaza-3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-diquinolincyclodecaphane (UCL 1684), the first nanomolar, non-peptidic blocker of the apamin-sensitive Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ channel. *J Med Chem* 41: 2-5.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729-749.
- Rusko, J., Tanzi, F., van Breemen, C., Adams, D. J. (1992). Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J Physiol* 455: 601-621.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saliez, J., Bouzin, C., Rath, G., Ghisdal, P., Desjardins, F., Rezzani, R., Dessy, C. (2008). Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 117: 1065-1074.
- Sampson, L. J., Hayabuchi, Y., Standen, N. B., Dart, C. (2004). Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 95: 1012-1018.
- Sandow, S. L., Senadheera, S., Grayson, T. H., Welsh, D. G., Murphy, T. V. (2012). Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv Exp Med Biol* 740: 811-831.

- Santibanez, J. F., Blanco, F. J., Garrido-Martin, E. M., Sanz-Rodriguez, F., del Pozo, M. A., Bernabeu, C. (2008). Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. *Cardiovasc Res* 77: 791-799.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., Lisanti, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122: 789-807.
- Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Lisanti, M. P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272: 29337-29346.
- Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C. C., Lodish, H. F. (1994). Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol*, 127(5), 1233-1243.
- Schilling, K., Opitz, N., Wiesenthal, A., Oess, S., Tikkanen, R., Muller-Esterl, W., Icking, A. (2006). Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol Biol Cell* 17: 3870-3880.
- Schilling, W. P., Rajan, L., Strobl-Jager, E. (1989). Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. *J Biol Chem* 264: 12838-12848.
- Schlegel, A., Lisanti, M. P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* 275: 21605-21617.
- Schlormann, W., Steiniger, F., Richter, W., Kaufmann, R., Hause, G., Lemke, C., Westermann, M. (2010). The shape of caveolae is omega-like after glutaraldehyde fixation and cup-like after cryofixation. *Histochem Cell Biol* 133: 223-228.
- Schubert, A., Cattaruzza, M., Hecker, M., Darmer, D., Holtz, J., Morawietz, H. (2000). Shear stress-dependent regulation of the human beta-tubulin folding cofactor D gene. *Circ Res* 87: 1188-1194.
- Sdougos, H. P., Schultz, D. L., Tan, L. B., Bergel, D. H., Rajagopalan, B., Lee Gde, J. (1982). The effects of peripheral impedance and inotropic state on the power output of the left ventricle in dogs. *Circ Res* 50: 74-85.

- Segal, S. S. (2005). Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 12: 33-45.
- Shen, J., Lusinskas, F. W., Connolly, A., Dewey, C. F., Jr., Gimbrone, M. A., Jr. (1992). Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 262: C384-390.
- Shigematsu, H., Sokabe, T., Danev, R., Tominaga, M., Nagayama, K. (2010). A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *J Biol Chem* 285 11210-11218.
- Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M. K., Nakaike, R., Fukumoto, Y., Takeshita, A. (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 703-711.
- Shirinsky, V. P., Antonov, A. S., Birukov, K. G., Sobolevsky, A. V., Romanov, Y. A., Kabaeva, N. V., Smirnov, V. N. (1989). Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J Cell Biol* 109: 331-339.
- Simionescu, N., Simionescu, M., Palade, G. E. (1975). Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 64: 586-607.
- Simons, K., Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.
- Singh, B. B., Liu, X., Ambudkar, I. S. (2000). Expression of truncated transient receptor potential protein 1alpha (Trp1alpha): evidence that the Trp1 C terminus modulates store-operated Ca^{2+} entry. *J Biol Chem* 275: 36483-36486.
- Singh, S., Syme, C. A., Singh, A. K., Devor, D. C., Bridges, R. J. (2001). Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 600-611.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Lisanti, M. P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304.
- Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 271: 9690-9697.

- Song, M. Y., Yuan, J. X. (2010). Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Adv Exp Med Biol* 661: 99-108.
- Sonkusare, S. K., Bonev, A. D., Ledoux, J., Liedtke, W., Kotlikoff, M. I., Heppner, T. J., Nelson, M. T. (2012). Elementary Ca^{2+} signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* 336: 597-601.
- Stan, R. V. (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746: 334-348.
- Steinhauer, C., Forthmann, C., Vogelsang, J., Tinnefeld, P. (2008). Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *J Am Chem Soc* 130: 16840-16841.
- Stevens, T., Garcia, J. G., Shasby, D. M., Bhattacharya, J., Malik, A. B. (2000). Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-422.
- Stocker, M. (2004). $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated K^+ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5: 758-770.
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J., Bertram, R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev* 31: 845-915.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2: 695-702.
- Sumagin, R., Brown, C. W., 3rd, Sarelius, I. H., King, M. R. (2008). Microvascular endothelial cells exhibit optimal aspect ratio for minimizing flow resistance. *Ann Biomed Eng* 36: 580-585.
- Sun, R. J., Muller, S., Stoltz, J. F., Wang, X. (2002). Shear stress induces caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells. *Eur Biophys J* 30: 605-611.
- Syme, C. A., Gerlach, A. C., Singh, A. K., Devor, D. C. (2000). Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated $\text{K}^{(+)}$ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C570-581.
- Syme, C. A., Hamilton, K. L., Jones, H. M., Gerlach, A. C., Giltinan, L., Papworth, G. D., Devor, D. C. (2003). Trafficking of the Ca^{2+} -activated K^+ channel, hIK1, is dependent upon a C-terminal leucine zipper. *J Biol Chem* 278: 8476-8486.

- Taylor, M. S., Bonev, A. D., Gross, T. P., Eckman, D. M., Brayden, J. E., Bond, C. T., Nelson, M. T. (2003). Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ Res* 93: 124-131.
- Tobelem, G. (1990). Endothelial cell growth: biology and pharmacology in relation to angiogenesis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1:703-705.
- Traub, O., Berk, B. C. (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685.
- Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., Ding, H. (2012). The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 713-738.
- Troidl, C., Troidl, K., Schierling, W., Cai, W. J., Nef, H., Mollmann, H., Schaper, W. (2009). Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *J Cell Mol Med* 13: 2613-2621.
- Urakami-Harasawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A. (1997). Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100: 2793-2799.
- Vaca, L., Kunze, D. L. (1994). Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a $\text{Ca}^{(2+)}$ -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol* 267: C920-925.
- Vaca, L., Licea, A., Possani, L. D. (1996). Modulation of cell membrane potential in cultured vascular endothelium. *Am J Physiol* 270: C819-824.
- Valente, P., Garcia-Sanz, N., Gomis, A., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Viana, F., Ferrer-Montiel, A. (2008). Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor 1. *FASEB J* 22: 3298-3309.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8: 321-329.
- Verma, P., Kumar, A., Goswami, C. (2010). TRPV4-mediated channelopathies. *Channels (Austin)* 4: 319-328.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-754.

- Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., Nilius, B. (2004). Outer pore architecture of a Ca^{2+} -selective TRP channel. *J Biol Chem* 279: 15223-15230.
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 277: 33704-33710.
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 75: 1262-1279.
- Vriens, J., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., Nilius, B. (2007). Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 282: 12796-12803.
- Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 396-401.
- Wagner, H., (2012). Application note 13: Huvecs under perfusion.
- Walsh, M. P., Kargacin, G. J., Kendrick-Jones, J., Lincoln, T. M. (1995). Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 565-573.
- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., Ito, H. (2008). TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118: 337-351.
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424: 434-438.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 47044-47051.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 463-472.
- Weston, A. H., Absi, M., Ward, D. T., Ohanian, J., Dodd, R. H., Dauban, P., Edwards, G. (2005). Evidence in favor of a calcium-sensing receptor in arterial endothelial cells: studies with calindol and Calhex 231. *Circ Res* 97: 391-398.

- Wissenbach, U., Bodding, M., Freichel, M., Flockerzi, V. (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* 485: 127-134.
- Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D., Shao, D. (1989). Proper function of the *Drosophila trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron* 3: 81-94.
- Woudenberg-Vrenken, T. E., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G. (2009). The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5: 441-449.
- Wu, L. J., Sweet, T. B., Clapham, D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62: 381-404.
- Wulff, H., Miller, M. J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8151-8156.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 445-458.
- Yamamoto, Y., Imaeda, K., Suzuki, H. (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol* 514: 505-513.
- Yao, X., Garland, C. J. (2005). Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 97: 853-863.
- Zantl, R. (2012). Shear stress and shear rates for all channel μ -slides based on numerical calculations. *Application note* 11.
- Zhang, D. X., Gutterman, D. D. (2011). Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 133-139.

7 Anhang

7.1 Publikationen

Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Kacik, M., Markert, S., Hofmeister, A., Busch, C., Hoyer, J. (2015). Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/KCa in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 94: 391-400.

7.2 Wissenschaftliche Vorträge und Posterpräsentationen

Goedicke-Fritz, S., Grgic, I., Kaistha, A., Hofmeister, A., Markert, S. und Hoyer, J.: **Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav1/TRPV4/K_{Ca} in caveolae of endothelial cells** (Poster), 38. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Dezember 2014, Berlin.

Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Bänfer, S., Jacob, R., Grgic, I. und Hoyer, J.: **Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav1/TRPV4/K_{Ca} in caveolae of endothelial cells** (Poster), *International Symposium on Mechanisms of Cellular Compartmentalization* – SFB 593, September 2014, Marburg.

Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Grgic, I. und Hoyer, J.: **Funktionelle Assemblierung von Caveolin-1/TRPV4/K_{Ca} in endothelialen Caveolae mediert fluß-induzierte Vasodilatation** (Vortrag), 37. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Dezember 2013, Münster.

Grgic, I., Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Hofmeister, A., Markert, S. und Hoyer, J.: **Caveolar microcompartments in endothelial cells and fibroblasts and new prospects** (Vortrag) – Klausurtagung SFB 593 2013, Kleinwalsertal, Österreich.

7.3 Wissenschaftliche Auszeichnungen

„Preis für die beste Postersession“ der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Berlin (2014).
Goedicke-Fritz, S., Grgic, I., Kaistha, A., Hofmeister, A., Markert, S. und Hoyer, J.: **Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav1/TRPV4/K_{Ca} in caveolae of endothelial cells.**

„Young Investigator Award 2013“ der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Münster (2013).
Goedicke-Fritz, S., Kaistha, A., Grgic, I. und Hoyer, J.: **Funktionelle Assemblierung von Caveolin-1/TRPV4/K_{Ca} in endothelialen Caveolae mediert fluß-induzierte Vasodilatation.**

„Promotionspreis 2015“ der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Saarbrücken (2015).
Goedicke-Fritz, S., **Hinweise für eine funktionelle und dynamische Mikrokompartmentierung in den Caveolae von Endothelzellen.**

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Justus-Liebig Universität Gießen waren die Damen und Herren Professoren bzw Privat-Dozenten:

Bindereif, Clauss, Dammann, Dorresteijs, Eggert, Forchhammer, Forreiter, Friedhoff, Friedrich, Göttlich, Hipke, Hughes, Jäger, Jauker, Klug, Kröger, Lakes-Harlan, Martin, Meiß, Pingoud, Renkawitz, Ross, Spengler, Stenzel, Trenczek, van Bel und Wolters.

7.5 Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich in dieser spannenden Phase meines Lebens begleitet haben.

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Hoyer für die großzügige Bereitstellung des interessanten Themas und der benötigten Mittel. Meinem Betreuer Herrn PD. Dr. Ivica Grgic danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge sowie die gute Betreuung, die erst zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Person und meine Arbeit, sowie die Möglichkeit meine Ergebnisse auf zahlreichen Tagungen zu präsentieren, sage ich herzlichen Dank.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Jacob für die Bereitstellung des Leica SR GSD (DMI 6000B TIRF) Mikroskops und Herrn Sebastian Bänfer für die intensive Einarbeitung in die hochauflösende Mikroskopietechnik und für die Hilfestellungen bei der Datenauswertung.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Anuradha Kaistha für die ausführliche Einarbeitung in das Projekt und die anfängliche Betreuung. Für die Einarbeitung in die Elektrophysiologie und die Bereitstellung seiner Patch Clamp Daten danke ich Herrn Dr. Michael Kacik.

Darüber hinaus danke ich meinen Mitdoktoranden Frau Sabrina Markert, Herrn Maximilian Thomaßen und Herrn Andreas Hofmeister für unzählige Momente während unserer gemeinsamen Zeit am Institut, an die ich mich immer gerne zurück erinnern werde. Der offene und freundliche Umgang miteinander, sowie die Hilfsbereitschaft in vielerlei Hinsicht haben dazu beigetragen, dass ich mich hier immer wohl gefühlt habe.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors der Neonatologie, Frau Sabine Jennemann, Frau Regina Stöhr, Frau Aparna Renigunta und Herrn Dr. Tobias Rogosch möchte ich für die großartige Unterstützung innerhalb sowie außerhalb des Laboralltages danken.

Für die Finanzierung meiner Arbeit danke ich dem Sonderforschungsbereich 593 „Mechanismen der zellulären Kompartimentierung und deren krankheitsrelevante Veränderungen“.

All meinen lieben Freunden danke ich für die wertvolle Ablenkung zwischendurch und die zahlreichen ermutigenden Worte. Meiner Freundin Julia danke ich für ihre treue Freundschaft und die geduldige Korrekturlesung.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für Ihren Zuspruch und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ihr seid wundervoll.

Abschließend gilt noch ein besonderer Dank meinem Mann Sebastian Fritz, der mich während der Erstellung der vorliegenden Arbeit durch seinen Zuspruch ermutigt und in jeder Situation unterstützt hat.